

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Fyziologie živočichů



Bc. Jakub Slepíčka

**MODULACE MÍŠNÍHO SYNAPTICKÉHO PŘENOSU
PŘI VZNIKU BOLESTIVÝCH STAVŮ**

MODULATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION
IN THE DEVELOPMENT OF PAINFUL STATES

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Jiří Paleček, CSc.

Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i.
Oddělení Funkční morfologie

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci pod vedením MUDR. Jiřího Palečka, CSc. zpracoval samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu na konci této práce. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 26. 4. 2019

Podpis

Poděkování

Diplomovou práci jsem vypracoval pod vedením MUDr. Jiřího Palečka, CSc., který při konzultacích se mnou projevila mnoho trpělivosti a poskytl mi řadu cenných rad ke zpracování této práce a také zkušeností s experimentální prací. Tímto mu děkuji za čas a za jeho pozitivní přístup, díky němuž jsem byl schopen práci úspěšně dokončit. Jsem vděčný Dianě Špicarové, Ph.D., že se také podrobně věnovala revizím mé práce. Děkuji Petře Mrózkové, Ph.D. a především Mgr. Pavlu Adámkovi za předání svých teoretických i praktických znalostí s použitými metodami a za cennou pomoc s řešením metodických i teoretických problémů. Děkuji Mgr. Máriu Helešovi a zejména Kateřině Kramerové za častou pomoc nejen s přípravou materiálu, ale také za tvorbu příjemného pracovního prostředí.

Abstrakt

Má práce uvádí do problematiky nociceptivní signalizace a procesů zapojených do vzniku a formování neuropatické bolesti. Věnuje se studiu mechanismů nociceptivního synaptického přenosu na míšní úrovni a možnostem jeho modulace paclitaxelem, chemoterapeutikem navozujícím neuropatické změny.

Pozornost je věnována především možnosti zapojení aktivity gliových buněk při nežádoucím působení tohoto léčiva. Tato hypotéza využívá důkazů funkčního spojení aktivity Toll-like 4 receptorů s aktivitou TRPV1 receptorů důležitých pro vnímání různých chemických a tepelných senzorických podnětů a také v nociceptivním synaptickém přenosu. K blokaci aktivace mikroglií bylo využito antibiotikum minocyklin zamezující vzniku neuroinflamace.

Praktická část potom sleduje a porovnává vliv použitých látek na model procesu tachyfylaxe používaný pro sledování změn nociceptivní signalizace vlivem snižování aktivity TRPV1 receptorů. Práce ke zkoumání tohoto jevu využívá elektrofyziologické snímání aktivity miniaturních excitačních postsynaptických proudů neuronů I. a II. Rexedovy laminy zadního míšního rohu.

Výsledky měření ukazují, že inkubace míšních řezů v minocyklinu *in vitro* potlačuje akutní působení paclitaxelu. Toto potlačení aktivace mikroglií naznačuje, že se gliové buňky svou aktivitou podílejí na modulacích nociceptivního synaptického přenosu při vzniku neuropatických stavů navozených aplikací paclitaxelu.

Klíčová slova

Bolest, nocicepce, mícha, zadní roh míšní, synapse, neuropatie, TRPV1, kapsaicin, TLR4, paclitaxel, CIPN, DRG, EPSC

Abstract

My thesis introduces the topic of nociceptive signalisation and processes involved in the formation and spreading of neuropathic pain. This study focuses on the mechanisms of nociceptive synaptic transmission mechanisms in the level of spinal dorsal horn and its modulation by paclitaxel, a chemotherapeutic drug inducing neuropathic changes.

The attention is put especially on the possibility of glial activity participation in paclitaxel side effects. This idea stems from the existing hypothesis of the functional connection between TLR4 and TRPV1 receptor activity. TRPV1 is well known for its participation in chemical, thermal and nociceptive sensory transmission. Minocycline antibiotic is considered as an inhibitor of microglial activation therefore it was used for blocking neuroinflammation.

The experimental part is comparing an impact of substances applied to the model of tachyphylaxis used for monitoring of nociceptive transmission changes according to decreasing activity of TRPV1 receptors. Electrophysiological recording of miniature excitatory postsynaptic currents from neurons in the Rexed laminae I. and II. of spinal dorsal horn was used.

The results of my measurements show that minocycline is able to suppress acute effects of paclitaxel application in vitro if the spinal slice is incubated in minocycline for ninety minutes before and also during the experiment. Induced suppression of glial activity indicates that glial cell activation is participating in the modulation of nociceptive synaptic transmission during paclitaxel induced neuropathic pain states formation.

Keywords

Pain, nociception, spinal cord, dorsal horn, synapse, neuropathy, TRPV1, capsaicin, TLR4, paclitaxel, CIPN, DRG, EPSC

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	1
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÝ PŘEHLED	7
2.1 NOCICEPCE	7
2.1.1 <i>Neurony spinálních ganglií (DRG) a jejich morfologie</i>	8
2.1.2 <i>Neurony zadních rohů míšních</i>	10
2.1.3 <i>Synaptický přenos nocicepce z míchy do vyšších center</i>	11
2.1.4 <i>Způsoby modulace míšní nocicepce</i>	13
2.2 BOLEST	15
2.2.1 <i>Vznik bolestivých stavů</i>	16
2.3 NEUROPATICKÉ STAVY	17
2.3.1 <i>Chemoterapeutiky navozené neuropatie (CIPN)</i>	19
2.4 TRP RECEPTORY	22
2.4.1 <i>Charakteristika TRPV1 receptoru</i>	23
2.4.2 <i>Exprese TRPV1</i>	25
2.4.3 <i>Funkce TRPV1 v nervové soustavě</i>	25
2.5 TOLL-LIKE RECEPTORY	26
2.5.1 <i>Obecná struktura TLR</i>	27
2.5.2 <i>Vlastnosti TLR receptorů</i>	27
2.6 TLR4 RECEPTOR	28
2.6.1 <i>Ligandy TLR4</i>	29
2.6.2 <i>Výskyt TLR4 v nervové soustavě</i>	30
2.6.3 <i>Úloha TLR4 v nervové soustavě</i>	30
2.6.4 <i>Úloha TLR4 při neuropatických stavech</i>	31
2.7 GLIOVÉ BUŇKY	32
2.7.1 <i>Úloha gliových buněk v neuropatii</i>	33
2.7.2 <i>Neuroinflamace</i>	33
2.7.3 <i>Minocyklin a jeho působení</i>	34

3	METODIKA	36
3.1	CÍLE PRÁCE	36
3.2	POKUSNÁ ZVÍŘATA	37
3.3	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	37
3.3.1	<i>Specifika experimentálních skupin</i>	39
3.4	APARATURA A PŘÍSLUŠENSTVÍ	41
3.5	PŘÍPRAVA AKUTNÍCH MÍŠNÍCH ŘEZŮ	41
3.6	ZHOTOVENÍ SKLENĚNÝCH SNÍMACÍCH MIKROELEKTROD	42
3.7	ELEKTROFYZIOLOGICKÉ MĚŘENÍ	43
3.7.1	<i>Parametry experimentálních protokolů</i>	45
3.8	VYHODNOCENÍ DAT	47
4	VÝSLEDKY	49
4.1	VLIV OPAKOVANÉ APLIKACE KAPSAICINU NA FREKVENCI MEPSC	49
4.2	VLIV APLIKACE PACLITAXELU NA TACHYFYLAXI ODPOVĚDI PŘI OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	49
4.3	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MINOCYKLINU NA ZMĚNU FREKVENCE MEPSC PŘI OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	52
4.4	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MINOCYKLINU NA PŮSOBENÍ PACLITAXELU NA TACHYFYLAXI PŘI OPAKOVANÉM PODÁNÍ KAPSAICINU	54
4.5	VLIV INKUBACE V MINOCYKLINU NA PŮSOBENÍ AKUTNÍ APLIKACE PACLITAXELU NA TACHYFYLAXI KAPSAICINU	56
4.6	POROVNÁNÍ VÝSLEDKŮ VŠECH EXPERIMENTÁLNÍCH SKUPIN	58
5	DISKUZE	64
5.1	ZMĚNA FREKVENCE MEPSC PO OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	64
5.2	VLIV PACLITAXELU NA TACHYFYLAXI PŘI OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	66
5.3	VLIV AKUTNÍ APLIKACE MINOCYKLINU NA ZMĚNU FREKVENCE MEPSC PŘI OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	67
5.4	VLIV MINOCYKLINU NA PŮSOBENÍ PACLITAXELU NA TACHYFYLAXI ODPOVĚDI PŘI OPAKOVANÉ APLIKACI KAPSAICINU	68
6	ZÁVĚR	72
7	POUŽITÁ LITERATURA	73

Seznam použitých zkratk

AMPA	α -amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate acid <i>kyselina α-amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropionová, agonista AMPA receptorů</i>
AP	action potential <i>akční potenciál</i>
CAP	capsaicin <i>kapsaicin, agonista TRPV1 receptoru</i>
CCI	chronic constriction injury model of neuropathy <i>model neuropatie vytvořený chronickou kompresí nervu</i>
CCL2	C-C motif chemokine ligand 2 <i>chemokin 2 ze skupiny s konzervovanou CC oblastí</i>
CCR2	CCL2 receptor <i>receptor pro chemokin CCL2</i>
CIPN	chemotherapy-induced peripheral neuropathy <i>periferní neuropatie indukovaná chemoterapií</i>
CNS	central nervous system <i>centrální nervový systém</i>
DAMP	damage associated molecular pattern <i>molekulární vzor asociovaný s poškozením organismu</i>
dECS	dissection extracellular solution <i>disekční extracelulární roztok</i>
DMSO	dimethyl sulfoxide <i>dimethyl sulfoxid, aprotické polární rozpouštědlo</i>
DRG	dorsal root ganglion, (spinal ganglion) <i>zadní míšní ganglion, (míšní uzel)</i>
DRt	dorsal reticular nucleus of the caudal medulla <i>dorzální retikulární jádro prodloužené míchy</i>
ECS	extracellular solution <i>roztok simulující extracelulární prostředí</i>
GABA	gamma-amino butyric acid <i>gama aminomáselná kyselina, inhibiční neuropřenašeč</i>
GFAP	glial fibrillary acidic protein <i>marker pro reaktivní astrocyty</i>

GLAST	glutamate and aspartic acid transporter <i>přenašeč glutamátu a aspartátu (kyseliny L-glutamové a L-asparagové)</i>
GLT	glutamate transporter <i>přenašeč glutamátu</i>
IASP	International Association for the Study of Pain <i>mezinárodní asociace pro výzkum bolesti</i>
ICS	intracellular solution <i>roztok simulující intracelulární prostředí</i>
IL	interleukin, type of cytokine <i>Interleukin, druh cytokinů</i>
KAR	kainate acid receptor <i>glutamatergní kainátový receptor</i>
LPS	lipopolysaccharide <i>lipopolysacharid</i>
LPS-RS(U)	LPS from <i>rhodobacter spheroidae</i> (Ultrapure extract) <i>LPS extrahovaný z bakterie rhodobacter spheroidae (Ultračistá forma)</i>
MAPK	mitogen-activated protein kinase <i>mitogenem aktivovaná protein kináza</i>
MD-2	myeloid differentiation protein 2, Lymphocyte antigen 96 <i>lymfocytární antigen 96</i>
mEPSC	miniature excitative postsynaptic current <i>miniaturní excitační postsynaptický proud</i>
MMP-9	matrix metalloproteinase-9 <i>metaloproteináza č. 9 obsažená v matrix</i>
MyD88	myeloid differentiation primary-response protein 88 <i>myeloidní diferenciacní faktor</i>
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells <i>jaderný factor kapa podporující aktivované B buňky</i>
NGF	nerve growth factor <i>nervový růstový faktor</i>
NK1R (=SPR)	neurokinine-1 receptor <i>receptor pro neurokinin (a také pro substanci P)</i>
NMDA	N-methyl-D-aspartate acid, NMDA receptor agonist <i>N-metyl-D-aspartát, agonista NMDA receptorů</i>

OLDA	N-oleoyl dopamine
PAC	paclitaxel
PAF	primary afferent fiber <i>aferentní vlákno primárního senzorického neuronu</i>
PAG	periaqueductal grey (substantia grisea) <i>periaqueduktální šed' kolem Silviova kanálku</i>
PAMP	pathogen associated molecular pattern <i>molekulární vzor, jehož rozeznání umožňuje imunitě objevit přítomnost patogenu v těle</i>
PI3K	phosphatidylinositol-3-kinase <i>kináza inositol trisfosfátu (IP3)</i>
PIPN	paclitaxel induced peripheral neuropathy <i>paclitaxelem navozená periferní neuropatie</i>
PKA, PKC	protein kinase (A or C) <i>proteinkináza (A, respektive C)</i>
PLA2	phospholipase A2
PRR	pattern recognition receptor <i>receptor rozeznávající specifické vzory</i>
ROS	reactive oxygen species <i>volné kyslíkové radikály</i>
RVM	rostral ventromedial medulla <i>rostrální ventromediální oblast prodloužené míchy</i>
sECS	recording extracellular solution <i>snímací extracelulární roztok</i>
SNL	spinal nerve ligation <i>podvaz míšního nervu</i>
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinases-1 <i>tkáňový inhibitor metaloproteináz č. 1</i>
TIR	Toll/ interleukin-1 receptor homology domain <i>Toll/interleukin-1 receptorová doména</i>
TIRAP	TIR adaptor protein(s) <i>adaptorové proteiny TIR domény</i>
TLR	Toll-like receptor
TNF α	tumor necrosis factor alpha <i>cytokin, alfa faktor nádorové nekrózy</i>

TRAM	TRIF related adaptor molecule <i>adaptorová molekula příbuzná TRIF</i>
TRIF	TLR-adaptor interferon β inducing protein <i>TLR-adaptorový protein indukující interferon β</i>
TRP	transient receptor potential <i>rodina TRP receptorů (subtypy v kapitole TRP receptory)</i>
TRPV1 (=VR1)	TRP vanilloid 1, vanilloid receptor (1) <i>vaniloidní receptor (1), kapsaicinový receptor</i>
VLM	ventrolateral quadrant of the caudal medulla <i>ventrolaterální prodloužená mícha</i>
WDR	wide dynamic range neuron <i>polymodální míšní neuron</i>

1 Úvod

V dnešní době máme k dispozici široké spektrum pokročilých technologií, které nám usnadňují komunikaci, cestování i stavitelství. Přibližuje se den, kdy bude běžné vystoupat na orbitu naší planety a s pomocí nových mikroskopických technik můžeme pozorovat povrchy látek až na atomární úrovni, ale přes zrychlující se pokrok zatím nedovedeme léčit bez nežádoucích vedlejších účinků chronické bolestivé neuropatické stavy.

Bolest je potřebný fyziologický mechanismus, který naše tělo chrání před poškozením. Pokud ale nemůžeme odstranit nebo ignorujeme příčinu akutního bolestivého stavu, tak tento stav může přetrvávat dlouhodobě a mění svůj charakter. Rozvine se v chronický bolestivý stav, který je pro naše současné medicínské možnosti stále obtížně léčitelný. Hlavní příčinou je neznalost přesných mechanismů vzniku těchto stavů patologické bolesti.

V této diplomové práci jsem věnoval bližší pozornost popisu mechanismů, jejichž prostřednictvím při užívání antineoplastických léčiv, konkrétně chemoterapeutika paclitaxelu, vznikají nežádoucí vedlejší účinky, zejména neuropatická bolest. Paclitaxel u řady pacientů v průběhu, a i po ukončení léčby vyvolává jako vedlejší účinek chorobnou neuropatickou bolest. Tyto bolestivé stavy často vedou ke změně či ukončení jejich protinádorové léčby paclitaxelem.

Ve své práci jsem vycházel ze známých mechanismů patofyziologického přenosu nociceptivního signálu a soustředil jsem se na elektrofyziologickou analýzu změn synaptického přenosu na míšní úrovni. Využíval jsem přitom poznatků z publikovaných prací a dalších výsledků oddělení Funkční morfologie AV ČR. Ty ukázaly, že paclitaxel působí na míšní úrovni přes TLR4 (Toll-like 4) receptory a následně moduluje funkci TRPV1 receptorů na presynaptických zakončeních primárních aferentních vláken v míše (Lin et al. 2015, Adamek et al. 2019). Exprese TLR4 receptorů byla prokázána jak na neuronech spinálních ganglií, tak na gliových buňkách. Cílem mé experimentální práce proto bylo prokázat, do jaké míry se na modulaci funkce TRPV1 receptorů nízkou koncentrací paclitaxelu podílí aktivace TLR4 receptorů na gliových buňkách. A tím také do jaké míry se podílí míšní gliové buňky na vzniku bolestivých stavů této neuropatie.

Pokusy byly provedeny in vitro na akutních transverzálních řezech míchy potkanů, na kterých byla elektrofyziologicky měřena aktivita postsynaptických proudů neuronů superficiální oblasti zadního míšního rohu vyvolaná aplikací agonisty TRPV1 receptorů, kapsaicinu. K blokádě aktivace gliových buněk (mikroglíí) jsem využíval antibiotikum minocyklin. Výsledky mých experimentů naznačily, že aktivace gliových buněk může hrát významnou úlohu při vzniku modulace funkce TRPV1 receptorů na míšní úrovni. Toto zjištění také naznačuje možnou významnou úlohu gliových buněk při vzniku bolestivých neuropatických stavů spojených s chemoterapií paclitaxelem.

2 Teoretický přehled

2.1 Nocicepce

Nocicepce je soubor fyziologických procesů vedoucích k pocitu bolesti. Začíná vznikem akčního potenciálu v nervových zakončeních po aplikaci bolestivého podnětu, tedy informace o potenciálně škodlivých změnách ve vlastním těle či o skutečném poškození organismu. Zahrnuje vedení těchto signálů a jejich následné zpracování v mozku a může vyústit ve vznik bolestivého vjemu.

Primární informace vzniká působením odpovídajícího stimulu na kůži, v orgánech či v pohybovém aparátu. Bolestí zasažené místo bývá nejčastěji mechanicky silně podrážděno, ale může být vystaveno i změnám teploty či chemických vlastností lokálního prostředí poblíž nervového zakončení, nebo být přímo poraněno v některé inervované části těla. Bolestivý podnět je detekován především **nociceptory**, volnými neopouzdrěnými nervovými zakončeními nociceptivně specifických primárních senzorických neuronů (Smith a Lewin, 2009). Na jejich výběžcích se nacházejí různé receptory, které jsou citlivé vůči změnám pH, teploty, extracelulární hladiny iontů, například draselných, dále vůči výskytu prostaglandinů, leukotrienů či substance P v jejich okolí. Při standardních podmínkách se chovají jako mlčící receptory a aktivují se jen v případě změny teploty či pH nebo v přítomnosti například některé z výše zmíněných látek (Rokyta, 2006; Prato *et al.*, 2017).

K celkovému bolestivému projevu mohou přes odlišná nervová vlákna přispívat i další dvě skupiny senzorických receptorů, podle Rokyty (2006) zvaných nocisenzory, které jsou opouzdrěné a mají různou strukturu podle svých základních receptivních vlastností. Prvními jsou běžné polymodální receptory, ke kterým patří Ruffiniho tělíska, která detekují tah, teplo a chlad, a Krauseho tělíska pro chlad, tlak a bolest. Druhým typem nocisenzorů jsou vysokoprahové mechanoreceptory, které při standardních podmínkách rozpoznávají hlavně hmat, tah, tlak a vibrace.

Aktivace konkrétních nociceptorů umožňuje transdukcii informace o detekci nociceptivního stimulu na buněčnou úroveň. Depolarizuje se periferní zakončení primárního nociceptivně specifického neuronu, aktivují se zde přítomné napěťové sodné kanály a dojde ke vzniku a aferentnímu šíření frekvenčně kódovaného akčního potenciálu.

2.1.1 NEURONY SPINÁLNÍCH GANGLIÍ (DRG) A JEJICH MORFOLOGIE

Vzniklý nociceptivní stimul je z periferie veden primárními aferentními vlákny (PAF) pseudounipolárních sensorických neuronů, kde se jejich centrální terminály rozvětvují a v několika vrstvách míchy tvoří synapse se sekundárními neurony. Těla primárních aferentních sensorických neuronů se nachází v zadních míšních gangliích (DRG), proto se také označují jako DRG neurony. Jelikož mají pseudounipolární morfologii, vede z každého somatu jediný výběžek, který se až následně rozděluje ve tvaru T do periferního (vstupního) a centrálního (výstupního) výběžku. Navzdory vstupnímu a výstupnímu označení těchto výběžků probíhá komunikace, respektive přenos některých látek a vezikulů i v opačném, retrográdním směru (Woolf a Ma, 2007; Basbaum *et al.*, 2009; Dubin a Patapoutian, 2010).

Lidské tělo je schopno vnímat různé formy bolesti, jejichž působení na sebe často při vývoji zranění navazuje. Rychlá a ostrá bolest může být v další fázi doplněna anebo nahrazena pomalejší a tupě pociťovanou bolestí, která trvá delší dobu. Morfologický podklad rozdílu mezi těmito formami bolesti je určen především mohutností nervových vláken vycházející z úrovně myelinizace a také velikosti somatu příslušných primárních sensorických neuronů. C vlákna nejsou od okolního prostředí elektricky izolována myelinovou pochvou, a proto vedou nejpomalejší (0,5-2m/s), tupě se projevující bolest. Jejich somata jsou malá a jejich vlákna mají také nejmenší průměr, kolem 1 μm , a sdružují se v Remakových svazcích, kde jsou obklopena nemyelinizujícími schwannovými buňkami. Populace tzv. „mlčících vláken“ má vysoký sensorický práh potřebný k jejich přechodu z mlčícího stavu do aktivovaného. Další typy C vláken včetně polymodálních mají nižší aktivační práh. Podněty o ostré bolesti, především mechanického původu, jsou při fyziologických podmínkách do míchy vedeny prostřednictvím slabě myelinizovaných **A δ** vláken o tloušťce do 6 μm , které mají rychlost vedení vzruchu vyšší, mezi 5 a 30 m/s, a somata malé až střední velikosti (Lawson, 2002; Smith a Lewin, 2009). Bylo vypořádováno, že malá těla neuronů mívají tenká nebo střední vlákna a velká somata mají tlustá vlákna, proto silně myelinizovaná **A β** vlákna o průměru 12-20 μm patří největším sensorickým neuronům. Tyto neurony vedou vzruchy rychlostí 70-120 m/s a standardně nepřenáší nociceptivní stimuly, ale zejména informace ze svalových vřetének a Golgiho šlachových orgánů (McHugh a McHugh, 2000; Cavanaugh *et al.*, 2009).

Mezidruhově však v dělení podle typu přenášené informace existují rozdíly. U některých živočichů, například krys, k nocicepci slouží výhradně C vlákna. U lidí tvoří mlčící nociceptory téměř čtvrtinu ze všech C vláken v kůži, ovšem krysy jich mají minimum (Schmidt *et al.*, 1995; Rokyta, 2006; Prato *et al.*, 2017). V patologických podmínkách mohou i nejrychlejší A β neurony iniciovat nociceptivní signalizaci. Mohou v takových podmínkách podlehnout „přepnutí fenotypu“, kdy začnou syntetizovat pronociceptivně působící substanci P, která při extrasynaptické difuzi může aktivovat blízké nociceptivní neurony druhého řádu (Neumann *et al.*, 1996).

Rozlišení různých nociceptivních vjemů může být způsobeno již na úrovni periferních receptorů. Příkladem je vedení informace o potenciálně škodlivých mechanických stimulech odlišnou populací nociceptivních neuronů než informace o škodlivém teple. Teplotní senzitivita je zajištěna řadou periferních receptorů odpovídajících na různá teplotní rozmezí, včetně TRPV1-4 a TRPM8, přičemž škodlivé teploty rozeznávají především vysokoprahové receptory (Patapoutian *et al.*, 2003; Hiura, 2009). Detekce poškozujících teplot je podle recentních zjištění závislá především na trojici receptorů TRPV1, TRPM3 a TRPA1 (Story *et al.*, 2003; Vandewauw *et al.*, 2018). Informace o potenciálním mechanickém poškození zajišťuje oddělená populace nemyelinizovaných nociceptivních neuronů především prostřednictvím receptorů MRGPRD (MAS-related G-protein coupled receptor, family member D); (Cavanaugh *et al.*, 2009). Vynechám-li sodné a draselné kanály na neuronálních výběžcích, nutné pro samotný přenos akčních potenciálů, jsou pro přenos nociceptivní informace důležité i receptorové kanály na centrálních zakončeních DRG neuronů, jelikož umožňují výlev neuropřenašečů a ovlivňování další nociceptivní signalizace. Probíhá zde především exprese napětově ovládaných vápníkových kanálů (VGCC), které zprostředkovávají výlev neuropřenašečů, dále různých transportérů, které pomáhají upravovat vlastnosti vnitřního prostředí buňky, či exprese presynaptických NMDA receptorů (Ruscheweyh a Sandkühler, 2002)

2.1.2 NEURONY ZADNÍCH ROHŮ MÍŠNÍCH

Nociceptivní informace z povrchu těla je vedena především do superficiálních vrstev dorzální míchy, konkrétně neuronů I. a II. vnější i II. vnitřní rexedovy laminy. Vlákna zajišťující nocicepci proprioceptivních a hlubokých viscerálních oblastí vedou do hlubších vrstev dorzální míchy (V, VI, VII, VIII). V páté vrstvě působí na polymodální neurony, tzv. WDR, které v sobě sdružují centrální terminály aferentních vláken s různými typy vstupních podnětů (McHugh a McHugh, 2000).

Většina neuronů exprimuje mnoho typů receptorů, a proto jsou schopny reagovat na široké množství okolních podnětů, které mohou v sumaci vést k jejich aktivaci či inhibici. Na centrálním konci primárního sensorického neuronu se v presynaptickém zakončení depolarizace projeví vtokem vápenatých iontů VGCC receptory. Vazbou těchto iontů vápníku na přítomné váčky s neuropřenašeči, především molekulami glutamátu, dojde ke spojení váčků s membránou a vyloučení obsahu těchto váčků do centrální synapse. Ovšem i v případě, že je takto zvýšená intracelulární koncentrace vápníku příliš nízká, může dojít k částečnému, nekvantovému výlevu. Ten pak v závislosti na množství uvolněného neuropřenašeče způsobí pouze částečnou, ale měřitelnou postsynaptickou odpověď (Stevens a Williams, 2000; Boyette-Davis, Walters a Dougherty, 2015).

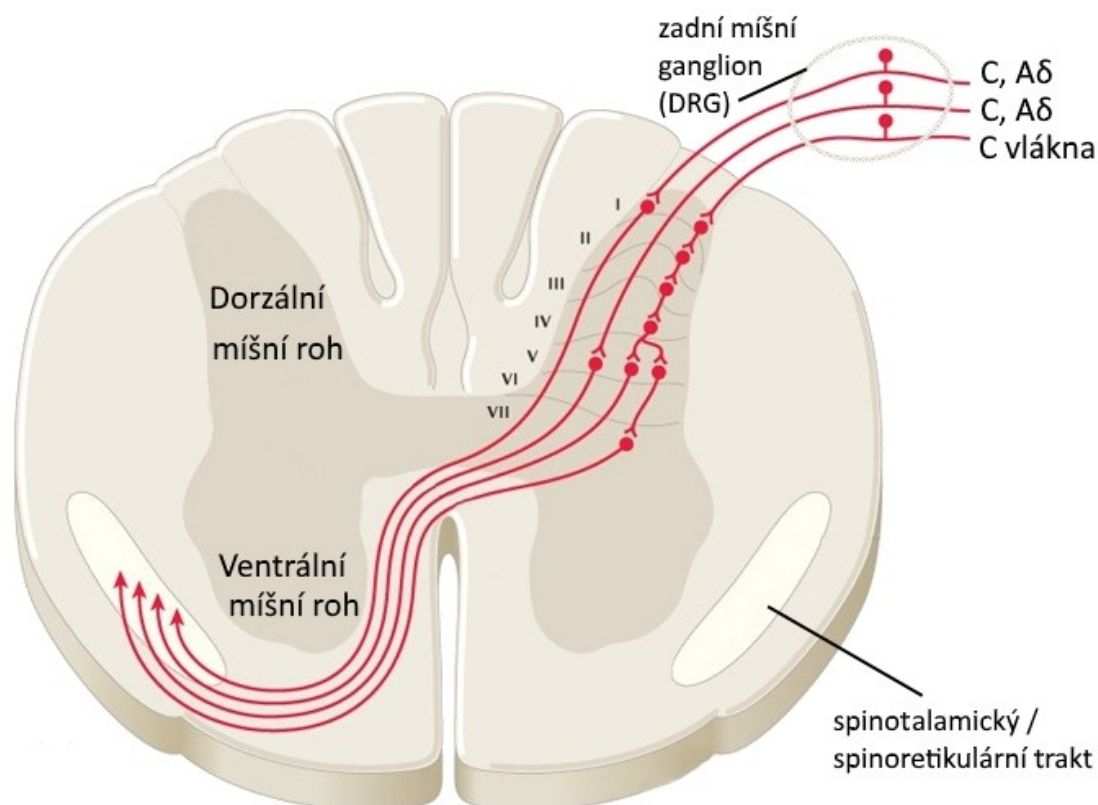
Hlavními postsynaptickými receptory, které reagují na presynaptický výlev neuropřenašečů depolarizovaných centrálních terminál DRG neuronů jsou především ionotropní glutamatergní receptory – AMPA, NMDA a v případě výraznější stimulace i KAR receptory (Ruscheweyh a Sandkühler, 2002). Mimo excitační receptory zde však nalézáme i receptory pro inhibiční neuropřenašeče, GABA a glycinové receptory (GABA_AR, GlyR), receptory pro řadu modulačních látek jako serotoninové, neurokininové, bradykininové, chemokinové (5-HTR, NK1R, B2R, CCR2), CGRP receptory a řadu dalších, jelikož v zadním míšním rohu dochází k prvním významným modulacím nociceptivního signálu (Gu a Yu, 2007; Zhuo, 2017).

2.1.3 SYNAPTICKÝ PŘENOS NOCICEPCE Z MÍCHY DO VYŠŠÍCH CENTER

Z míchy do supraspinálních center v mozku a prodloužené míše vedou signály o bolestivých podnětech prostřednictvím různých vzestupných nervových míšních drah. Do přenosu nociceptivní informace jsou zapojeny především níže popsané dráhy.

Hlavní drahou pro přenos informace o škodlivých podnětech bývá označována spinotalamická dráha, jež má zásadní význam například pro akutní nociceptivní signalizaci z kůže (Palecek, Paleckova a Willis, 2002) či pro termální nocicepci. Poškození této dráhy způsobené elektrickým proudem vedlo u zkoumaných potkanů k několikanásobnému snížení jejich tepelné citlivosti (Naseri *et al.*, 2013). Nelze ovšem říct, že by celou nociceptivní signalizaci zprostředkovávala pouze tato dráha, protože i další míšní dráhy přenáší část komplexní informace, například co se týká přesné lokalizace, intenzity, doby trvání a typu škodlivého stimulu, a celkový vjem vzniká integrací všech informací o potenciálně škodlivých podnětech až na subkortikální a kortikální úrovni (Yeziarski, 2007).

Spinotalamická dráha přenáší stimuly, které do míchy přicházejí zadními míšními kořeny z receptivních zakončení DRG neuronů ve vnitřních orgánech, svalech a kloubech a v kůži. Tyto primární senzory tvoří především v povrchových rexedových laminách (I a II) a v V. lamině synapse s těly sekundárních neuronů. Dál přecházejí aferentní vlákna sekundárních neuronů spinotalamické dráhy od synapsí s centrálními terminály DRG stejným transverzálním segmentem kontralaterálně do protější poloviny míchy a poté její ventrolaterální částí stoupají až do oblasti talamu, kde se přepojují na těla terciárních neuronů. Zde dochází k dalším modulacím nociceptivní informace, a pokud zde není potlačena inhibičními vlivy, je přenášena dál do mozkové kůry a podkorových oblastí, tedy bazálních ganglií a limbické oblasti. V mozku již komplexními integračními procesy vznikne výsledný vjem bolesti (Basbaum *et al.*, 2009).



Obrázek 1: Schéma transverzálního řezu zadním míšním rohem se znázorněním prvních sedmi Rexedových lamin a částí vzestupných nociceptivních drah. Těla primárních senzoryckých neuronů jsou uložena v zadním míšním gangliu (DRG). Mícha je uspořádána symetricky, takže obdobné uspořádání by šlo pozorovat i ve druhém míšním rohu. Upraveno podle Biswase (2015).

Část nociceptivních signálů projikuje do spinoretikulární (paleospinotalamické) dráhy, jež se nachází u všech obratlovců. Tato je součástí anterolaterálního systému, nemá somatickou organizaci a vede informace do talamu přes retikulární formaci. Třetí drahou je spinomezencefalická dráha. Neurony této dráhy projikují převážně do *coliculi superior* a některé směřují do periaquedukální šedi (*substantia grisea*) kolem Sylviova kanálku ve středním mozku. Spinoparabrachiální dráha se také zapojuje do přenosu somatosenzoryckých a nociceptivních informací. Neurony této dráhy projikují do několika oblastí párových parabrachiálních jader Varolova mostu laterálně od cerebelárních pedunklů spojujících mozeček s mozkovým kmenem (Yeziarski, 2007).

2.1.4 ZPŮSOBY MODULACE MÍŠNÍ NOCICEPCE

Na všech úrovních šíření nociceptivního signálu může docházet k jeho modulacím. Rozlišujeme facilitační, podpůrné vlivy, jenž pochází například z excitačních terminál okolních neuronů, a inhibiční, tlumivé, pocházející například z okolních inhibičních interneuronů nebo z neuromodulačních látek šířících se do vzdálenějších oblastí. Zároveň ovšem mohou účinkovat i facilitační nebo inhibiční mechanismy z vyšších, supraspinálních center, tzv. descendentní modulace. Některé modulační dráhy si trvale udržují slabou aktivitu, mají stabilní měřitelný tonus (Heinricher *et al.*, 2009; Colloca *et al.*, 2017).

Oblast kolem synapsí primárních neuronů se sekundárními neurony zadního míšního rohu je prvním významným modulačním místem. Aferentní synaptický přenos je inhibičními interneurony regulovaný prostřednictvím GABA či glycinu, inhibičních neuropřenašečů působících na příslušné receptory na sekundárních neuronech. Vznikající inhibiční postsynaptické proudy působí na tyto neurony hyperpolarizačně a brání vzniku akčního potenciálu. Inhibiční synapse mohou kontaktovat i presynaptickou buňku axo-axonálním spojením, kdy mohou potlačit i samotný výlev glutamátu. (Zeilhofer, Wildner a Yevenes, 2012).

V období krátce po narození u potkanů ovlivňují aktivitu nociceptivní signalizace sekundárních neuronů presynapticky exprimované kainátové receptory, které při výlevu glutamátu do centrální terminály DRG buňky propouští Ca^{2+} ionty a tím podporují další výlev glutamátu. Propustnost pro vápenaté ionty ale během několika dní vymizí. Význam jejich funkce se tak projevuje zejména v posilování nedávno vzniklých nociceptivních synapsí (C. J. Lee *et al.*, 2001).

Prozánětlivé látky jako prostaglandiny, cytokiny, neurokininy a zejména substance P či chemokin CCL2 mohou vazbou na své odpovídající receptory na neuronech či gliových buňkách také ovlivňovat aktivitu synaptického přenosu nociceptivních stimulů (Ji, Xu a Gao, 2014). Například vysoká koncentrace CCL2 působí na metabotropní CCR2 receptory na míšních neuronech a v řádu několika minut vede ke zvýšení spontánního excitačního synaptického přenosu prostřednictvím AMPA a NMDA kanálů. CCL2 však může zároveň působit i presynaptickou facilitací a zvyšovat tak výlev glutamátu z DRG neuronů, jelikož exprese CCR2 receptorů byla pozorována i na těchto neuronech (Gao *et al.*, 2009)

Ze supraspinálních modulací synaptického přenosu má v normálních podmínkách větší podíl descendentní inhibice. Primární oblastí zajišťující descendentní modulace je periaquedukální šed' (PAG), oblast kolem Sylviova kanálku spojujícího čtvrtou se třetí mozkovou komorou. Dalšími centry ovlivňujícími projekci bolesti jsou rostrální ventromediální oblast prodloužené míchy (RVM) a dvě oblasti kaudální prodloužené míchy, dorzální retikulární jádro (DRt) a ventrolaterální medulla (VLM). Sestupné dráhy bývají dopaminergní, cholinergní, noradrenergní či serotonergní (Millan, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2014). Kromě základních neuropřenašečů je využívána řada neuromediátorů, mezi kterými jmenujme například neuropeptid Y, neurotrofiny, cholecystokinin, bradykinin a substanci P (Basbaum *et al.*, 2009; Gautam *et al.*, 2016). Sestupné dráhy mohou využívat řadu modulačních mechanismů, počínaje regulací výlevu neuropřenašečů z terminál primárních aferentů, přes inhibici excitačních interneuronů, facilitaci inhibičních interneuronů synapticky kontaktujících sekundární neurony, a například nepřímými modulacemi skrze druhé posly konče (Pertovaara, 2006).

Příkladem struktury schopné inhibice i facilitace je RVM se svými serotonergními ON a OFF buňkami (François *et al.*, 2017). Kromě toho, že má RVM silné spojení s PAG, která může RVM řídit, mohou být obě tyto struktury ještě ovlivněny vyššími centry, především hypotalamem či amygdalou, které využívají descendentních modulací k úpravám vnímání bolesti mimo jiné podle psychického rozpoložení organismu. Například při vysokém stresu či strachu, kdy vnímáme bolest v omezené míře, se facilituje populace OFF buněk v RVM. Ta může v zadním míšním rohu působit výlevem serotoninu především na antinociceptivní (5-HT₁ a 7) receptory cílových buněk a ve výsledku tedy tlumit nociceptivní signalizaci (Ossipov, Morimura a Porreca, 2014). Oproti tomu mediální preoptická oblast hypotalamu nebo ventrolaterální orbitální kortex stimulují aktivaci ON buněk v RVM, které působí v míše pronociceptivně (Suzuki, Rygh a Dickenson, 2004; Heinricher *et al.*, 2009).

Mezi descendentními mechanismy funguje dynamická rovnováha. Ta je při patologických podmínkách narušena a posunuta k vyššímu uplatňování facilitačních vlivů. Ukazuje se, že se i takto posílené descendentní facilitace podílejí na udržování neuropatické bolesti, poruchy popsané v následující kapitole (Colloca *et al.*, 2017).

2.2 Bolest

Bolest je komplexní vjem, který vzniká až v mozku a je výsledkem integrace nociceptivních signálů přijímaných z téměř celého těla. Definice bolesti vycházející z Mezinárodní asociace pro výzkum bolesti zní: „*nepříjemný senzorický a emocionální zážitek spojený se skutečným či potenciálním poškozením tkáně, nebo popsáný na základě takového poškození*“ (IASP, 2018). Její hlavní význam tkví v ochraně organismu před jeho poškozením, které by mohlo vést k jeho smrti. V průběhu života se ale může stát, že budou fyzicky poškozeny nociceptivní dráhy přenášející podněty vedoucí k bolestivému vjemu, nebo se kumulací jiných negativních vlivů může stát, že tento původně výhodný ochranný mechanismus bude ovlivněn, pozměněn se a začne být organismu na obtíž.

Podle délky trvání rozdělujeme bolest na několik stupňů. Nejběžnější je **akutní** bolest ve formě rychlé reakce na potenciálně škodlivý stimul, která odezní během několika sekund, pokud správně odhadneme a vyhneme se původci tohoto stimulu. Druhým stavem je **subchronická** bolest, která v řádu maximálně několika týdnů provází léčení organismu po jeho fyzickém poškození, ale která po jeho vyléčení vymizí.

Nejzávažnějším bolestivým stavem je **chronická** bolest. Ta je již označována za chorobný stav, jehož přesná příčina vzniku může být neznámá nebo komplikovaná, a proto ji lékaři často neumí úspěšně léčit. Alespoň obecně ještě můžeme chronickou bolest rozlišit podle původu na **zánětlivou bolest** provázející infekci těla patogenními organismy nebo nějakou toxickou látkou a na **neuropatickou bolest**, která vzniká následkem přímého poškození nervové soustavy.

Chronická bolest bývá doprovázena *allodynii*, bolestí pociťovanou na konkrétních oblastech těla, jejichž stimulace dotykem či teplotou, kterou na ni působíme, by neměly vyvolávat bolest. Podle typu podnětu se rozlišuje mechanická, termální či pohybová. Druhým jevem vyskytujícím se při chronických bolestivých stavech bývá *hyperalgezie*, zvýšená bolestivost odpovídající stimulu, který normálně působí slabší bolest (IASP, 2018). Rozlišujeme primární hyperalgezii pocházející přímo ze zasažené oblasti nebo jejího blízkého okolí a sekundární hyperalgezii pociťovanou na místech vzdálených od zraněné či infikované oblasti.

Během posledních let proběhla řada studií zabývajících se rozsahem problémů spojených s léčbou chronických bolestivých stavů. Nejrozsáhlejší americká studie poslední doby vyčíslila roční náklady USA spojené s léčbou bolesti na 560-635 miliard dolarů. Částka zahrnovala přímé náklady na léčbu a také kalkulaci ztrát způsobených snížením produktivity práce (Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education, 2011). Proběhly také studie hodnotící prevalenci chronické bolesti, které nejspíš i z důvodu rozdílných metod sběru dat přinesly výsledky s širokým rozptylem, ale neměly by být podceňovány. Globálně vycházela prevalence od 2 do 55 %, v rámci Evropy mezi 5 a 33 % a ve Spojených státech mezi 15 a 64 % (Ossipov, Morimura a Porreca, 2014).

2.2.1 VZNIK BOLESTIVÝCH STAVŮ

V případě infekce či působení toxických látek se v postiženém místě vytváří zánětlivé prostředí, v němž se mění chemismus a exprese komunikačních látek a v nociceptivních drahách dochází k výlevu odlišných neuromodulátorů než standardně.

Po zranění dochází v těle v souvislosti s reparativními procesy také k indukci *sproutingu*, nového rozvětřování neuronálních výběžků, a tím může dojít k různým morfologickým změnám v rozložení synapsí včetně napojení na jiná nervová vlákna (Rokyta, 2006). Pokud nějaký senzorický neuron vytvoří synapsi na blízkém vlákně nociceptivního neuronu, je pak i on aktivován zároveň s neuronem odpovídajícím na nebolestivý podnět, což se nakonec může projevit jako allodynie.

Ve fyziologickém klidovém stavu probíhají i v nervových drahách metabolické procesy a je udržována klidová aktivita. To se týká také descendentních modulačních okruhů. Tento klidový stav je zachováván v dynamické rovnováze. Změny okolí postiženého místa ale mohou způsobit senzitivizaci lokálních nociceptivních receptorů, klidový stav může být narušen a působení sestupných modulačních vlivů překonáno silně působícím nociceptivním vstupem z poškozeného místa. Pokud je poškozena přímo mícha, mohou být sestupné provazce přímo přerušeny a jejich vliv tak potlačen. U pacientů trpících neuropatickou bolestí bývají descendentní modulační vlivy i aktivita míšních interneuronů utlumeny (Ossipov, Morimura a Porreca, 2014; Colloca *et al.*, 2017).

V případě nefyziologického posílení sestupné facilitace či oslabení inhibice se facilitační působení sčítá se zvýšeným nociceptivním synaptickým přenosem a přispívá k jeho morfologickému ukotvení a přechodu v chronický stav, který se bude projevovat bolestí přetrvávající i po případném vyléčení původního poškození (Urban a Gebhart, 1999; McHugh a McHugh, 2000).

2.3 Neuropatické stavy

Následkem poškození nervové soustavy, nebo chorobných nefyziologických změn některé její součásti vzniká neuropatie. Projevem neuropatií často bývá přetrvávající bolest některé oblasti těla bez viditelných příčin vzniku. Ta se v zasaženém organismu může přesně nedefinovanými procesy vyvinout v chronickou bolest. Z důvodu širokého spektra příčin není rozřídění neuropatií snadné, nicméně je velmi důležité pro výběr co nejvhodnějších aktuálně dostupných terapeutických přístupů i kvůli jejich současné nedostačující úspěšnosti (Finnerup *et al.*, 2015). Z hlediska rozsahu rozlišujeme mononeuropatie, vzniklé postižením jednoho nervu, anebo polyneuropatie, postihující větší množství těchto nervů. Lidé nejčastěji trpí neuropatiemi způsobenými poškozením periferního nervstva, tzv. periferními neuropatiemi. Zvýšené riziko vzniku těchto neuropatií mají pacienti, kteří v minulosti kouřili, nebo kteří trpí diabetem. U diabetiků vzniká periferní neuropatie ve zhruba polovině případů, přičemž asi u 30 % z nich se rozvinou výrazné bolestivé projevy. K tomu v rozvinutých zemích přispívá i zvyšující se míra incidence diabetu. Progresi této poruchy lze zpomalit dodržováním diety a prováděním fyzických cvičení (Barrell a Smith, 2019). Periferní polyneuropatie se rozvíjejí i u části pacientů nakažených virem HIV (Colloca *et al.*, 2017).

Existují také centrální neuropatie vznikající v mozku nebo v míše. Příkladem jsou cerebrovaskulární změny po mrtvici, při Parkinsonově chorobě či jiných neurodegenerativních nemocech, nebo působením demyelinizačních poruch v míše jako u roztroušené sklerózy či neuromyelitis optica (Colloca *et al.*, 2017).

Neuropatie také rozlišujeme podle příčin vzniku. Z nejpalcivějších a nejrozšířenějších jmenuji periferní neuropatie provázející metabolická onemocnění jako dnes velmi rozšířený *diabetes mellitus* (Davies *et al.*, 2006), nebo méně běžná celiakie a myxedém. Druhým typem jsou traumatické neuropatie, vzniklé následkem

přímého poškození či zúžení nervových cest. Jsou to řezná či bodná poranění, Fantomová bolest po amputacích, poškození míchy či nehody při chirurgických zákrocích. Obtížně lokalizovatelná jsou ohniska neuropatií vzniklých následkem infekčních onemocnění. To se týká zejména postherpetické neuralgie po infekci virem *herpes zooster*, nebo infekce HIV, především v rozvojových zemích, kde je velmi vysoká promořenost tímto virem, a proto je zde i vysoký počet lidí postižených bolestivou formou neuropatie. Bolestivé poruchy vznikají i vlivem toxických látek absorbovaných v potravě či povrchem těla, mezi které patří arsen, rtuť, olovo a další těžké kovy, organofosfáty a organické sloučeniny jako hexan či akrylamid (Barrell a Smith, 2019).

Dalším závažným typem neuropatických poruch jsou polyneuropatie způsobené neurotoxitou léčiv. Jejich nežádoucí účinek často spočívá v inhibičním či destruktivním vlivu na některý z prvků klasického buněčného cyklu či metabolismu. Bolestivé formy neuropatií vznikají především působením cytostatických farmak užívaných k léčbě různých nádorů, největší podíl tvoří různé platinové deriváty (oxaliplatin, cisplatin), taxany (paclitaxel, docetaxel) nebo vinca-alkaloidy (vincristin, vinblastin) (Hur *et al.*, 2014). K významným látkám v tomto odvětví patří i imunomodulační thalidomid a inhibitor proteáz, bortezomib (Starobova a Vetter, 2017). Bolestivost sice nemusí být vždy trvalá v plné míře a po snížení dávky léku nebo po nějaké době od jeho úplného vysazení může částečně nebo zcela odeznít, ale vzhledem k závažnosti onkologického onemocnění je potřeba hledat jinou terapii, která již nemusí být stejně účinná. Navíc v případě některých léků, konkrétně Thalidomidu, jsou příslušné nervy poškozeny doživotně (Johnson *et al.*, 2011). Další neurotoxiny pochází z antibiotik (chlorochin, metronidazol, nitrofurantoin), léků proti arytmií (amiodaron, perhexilin, hydralazin) a jiných léčiv (kolchicin, disulfiram, pyridoxin) (Barrell a Smith, 2019).

2.3.1 CHEMOTERAPEUTIKY NAVOZENÉ NEUROPATIE (CIPN)

Se zvyšujícím se počtem lidí, kteří přežili nádorové onemocnění, jelikož podstoupili některou formu jeho léčby, se zvyšuje i množství případů, kdy pacienti trpí možnými nežádoucími účinky použitých léčebných prostředků. Existuje šest hlavních skupin látek, které jsou používány k léčbě nádorových onemocnění, a přitom poškozují i samotné periferní senzory a motorické neurony a způsobují tak neuropatie. Kromě výše zmíněných platinových derivátů, taxanů a vinca-alkaloidů jsou to inhibitory proteáz (bortezomid), imunomodulační látky (thalidomid) a epothilony (ixabepilon).

2.3.1.1 Klinický popis

Seretny a kolektiv (2014) byla první, kdo provedl metaanalýzu zabývající se epidemiologií chemoterapeutiky navozených neuropatií. Analyzovala 31 studií zahrnujících celkem 4179 pacientů léčených různými chemoterapeutiky v závislosti na druhu rakoviny. U téměř poloviny z nich (1960 lidí) se rozvinula některá z neuropatií. Analýzou zjistila, že téměř u 68 % z postižených přetrvávaly neuropatické projevy ještě během jednoho měsíce po ukončení léčby. Tři měsíce po ukončení léčby byla prevalence CIPN 60 % a až půl roku po ukončení léčby se jejich prevalence snížila na 30 % (Seretny *et al.*, 2014).

Z dlouholetého sledování účinků několika chemoterapeutik (oxaliplatin, vincristin, paclitaxel a bortezomib) byly vypořádány velké rozdíly mezi toxicitou jednotlivých látek a v prevalenci výskytu konkrétních neuropatií. Některá pozorování napomohla k ověření závislosti výskytu chemoterapeutiky navozených neuropatií na četnosti jejich podávání, a především na velikosti dávek těchto léčiv (Boyette-Davis, Walters a Dougherty, 2015).

Farmaka často působí na jednotlivé cílové množící se buňky na více úrovních, aby zabránila jejich dalšímu množení tím, že zablokují některé z molekul účastnících se přepisu genetické informace či dělení buňky, nebo vytvoří kovalentní vazbu přímo s některou z nukleových kyselin. Například oxaliplatin a cysplatin se v jádře naváží na DNA a crosslinkují blízké dvojice aminokyselin na antiparalelních řetězcích, čímž zabrání, aby se DNA při transkripci rozvolnila a mohla být přepsána (Starobova a Vetter, 2017). Konkrétní buňka pak v závislosti na množství takových blokováných oblastí ztrácí schopnost úspěšné syntézy nových proteinů, které jsou potřeba k buněčnému dělení, nebo běžnému metabolismu.

I když se objevila řada způsobů, kterými některá chemoterapeutika ovlivňují fungování zdravých buněk, nevytvořila tato zjištění dosud tak komplexní obraz, aby bylo možno dosáhnout úspěšného zabránění tvorby neuropatických změn těla pacientů. Jisté je, že nelze vycházet pouze ze znalosti mechanismů účinku těchto léčiv na nádorové buňky. Jelikož ani vzájemně příbuzná chemoterapeutika vždy nemusí způsobovat neuropatie, nelze vždy využít ani příbuznost léčiv pro vytváření společného postupu proti těmto poruchám. Navzdory tomu, že některá léčiva nevytváří trvalé či závažné problémy, ovlivní neuropatické bolesti během života sedm až deset procent lidí z celé populace a pro jejich obtíže je potřeba najít vhodná řešení (Colloca *et al.*, 2017).

2.3.1.2 Paclitaxelem navozená neuropatie

Z klinické studie prováděné na populaci Spojených států Amerických, která se věnovala vzniku periferních neuropatií působením léčiv, vychází paclitaxel s pětadesáti procentní šancí ke vzniku periferní neuropatie jako druhá nejhůře působící sledovaná látka hned po oxaliplatinu (Hur *et al.*, 2014). Paclitaxel je rostlinný alkaloid patřící mezi deriváty taxanů, jehož přírodní podoba, taxol, je extrakt z tisů (Zhang *et al.*, 2016). Podobně jako ostatní taxany je používán především pro léčbu solidních nádorů plic, pankreatu, prsu, prostaty a solidních gynekologických nádorů. Paclitaxel téměř neprochází skrz hematoencefalickou bariéru a podává se intravenózně (Weaver, 2014).

Paclitaxel i oxaliplatin byly v jedné studii odděleně použity pro tvorbu modelů neuropatické bolesti u potkanů, kterým poté byla aplikována jedna ze tří různých inhibičních látek blokujičích různé části mitochondriálního metabolismu. Po aplikaci rotenonu, oligomycinu i auranofinu došlo v obou modelech u zvířat k výraznému zhoršení projevů mechanické allodynies i hyperalgie. Xiao a kolektiv na modelu paclitaxelem indukované neuropatie ukázal, že se toto léčivo po intraperitoneální aplikaci ukládalo z měřených tkání nejvíce v játrech, poté v DRG, v míšních rozích a v menší míře i v sedacím nervu. Z měření oxidativního metabolismu mitochondrií vyzorovali, že paclitaxel působí selektivně na senzorké neurony, jelikož ve vzorku z těchto vláken byla při podávání substrátu (ADP) dostačujícího pro dosažení maximální úrovně oxidativní fosforylace změřena ve vzorku mitochondrií z míšních dorzálních kořenů výrazně nižší činnost než u mitochondrií z motorických

vláken. V kontrolních vzorcích přitom byla aktivita srovnatelná (Xiao *et al.*, 2011; Xiao a Bennett, 2012). Tato selektivita v rámci neuronů naznačila účast nějakého dalšího prvku ovlivňujícího fungování DRG neuronů, kromě samotného hromadění paclitaxelu v dotčené oblasti. Ovlivňujících prvků se později ukázalo být víc, včetně možné specifické aktivace TLR4 receptorů na buňkách primárních sensorických neuronů (Li *et al.*, 2014).

2.3.1.3 Působení paclitaxelu

Podávání paclitaxelu přispívá blokováním respiračního řetězce mitochondrií ke hromadění volných radikálů (ROS) vystavujících zasažené buňky oxidativnímu stresu, což může ovlivnit i další intracelulární procesy (Starobova a Vetter, 2017). Hromadění ROS bylo při PIPN pozorováno v tělech DRG neuronů i v míšních neuronech, spolu se zvýšenou hladinou enzymů s antioxidační aktivitou (McKenna *et al.*, 2016). Při vysokých dávkách paclitaxelu pak byla pozorována degenerace volných nervových zakončení sensorických neuronů v kůži, přičemž zbylé části neuronů nebyly takto poškozeny (Boyette-Davis *et al.*, 2011).

Studie na myších a na modelových rybách *Danio rerio* zdůrazňují význam matrixových metalopeptidáz (MMP), proteolytických enzymů štěpících proteiny v mezibuněčném prostoru. Tyto endoproteázy fungují při zánětlivých a regeneračních procesech, často následkem působení oxidativním stresu. Především exprese MMP-2 a MMP-9 jsou při neuropatii zvýšeny. Na pociťování neuropatické bolesti má podle Tonella význam v narušení kontaktu volných nervových zakončení v kůži s bazálními keratinocyty a jejich následná degenerace. Intratekální aplikací monoklonálních protilátek proti MMP-9 této degeneraci zabránil a byly potlačeny projevy mechanické allostonie (Tonello, Lee a Berta, 2018).

Paclitaxel, respektive taxany, mají na množící se rakovinné buňky toxický účinek z důvodu své vazby na β podjednotky mikrotubulů. Tím je stabilizují, brání jejich disagregaci a opětovné přestavbě a znemožní tak správný transport látek i buněčné dělení (Starobova a Vetter, 2017). Uvnitř nádorů může při buněčném dělení i v nižších koncentracích například způsobovat nesouměrné dělení buněk, které vede k zániku jejich mitotických potomků (Weaver, 2014).

Podávání paclitaxelu podle práce pana Li a kolektivu ve spolupráci se členy laboratoře Funkční morfologie AVČR může působit pronociceptivně i cestou senzitivace nociceptivních TRPV1 receptorů na DRG neuronech a také na míšních neuronech prostřednictvím aktivace membránových Toll-like 4 receptorů (Li, Adamek, *et al.*, 2015; Adamek, Heles a Palecek, 2019).

Aby se mohlo zabránit dalšímu nežádoucímu působení těchto léčiv, je potřeba více integrovat dosavadní poznatky a také ještě blíže charakterizovat jednotlivé nociceptivně specifické membránové receptory, respektive iontové kanály, jelikož již od počátku určují funkční vlastnosti nociceptivních drah. Jednou z velkých a významných receptorových rodin, které mají nociceptivně specifické členy, je rodina TRP receptorů (Jardín *et al.*, 2017).

2.4 TRP receptory

TRP receptory, někdy označované jako tranzientní receptorové potenciálové kanály, jsou široce rozšířenou rodinou kationtových kanálů. Tyto kanály se otevírají přechodnou vazbou specifických ligandů nebo výraznou změnou fyzikálních podmínek okolí a jejich aktivace vede ke vtoku především sodných a vápenatých iontů do buňky a její následné depolarizaci, která iniciuje další přenos informace. V současnosti u savců známe dvacet osm různých zástupců této rodiny, které rozdělujeme podle jejich sekvenční homologie do dvou skupin dále dělených do šesti podrodin. Do první skupiny patří ankyrinové (TRPA), kanonické (TRPC), melastatinové (TRPM) a vaniloidní (TRPV) receptory, do druhé skupiny potom mukolipinové (TRPML) a polycystinové (TRPP) receptory. Do první skupiny patří ještě podrodina TRPN („No mechanoreceptor potential C“, NOMPC), objevená dosud jen u *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila sp.* a *Danio rerio*. A samostatně stojí TRP kanál TRPY1, který byl pozorován jen u kvasinek (Pedersen, Owsianik a Nilius, 2005; González-Ramírez *et al.*, 2017).

TRP receptory sdílejí základní strukturu. Jejich vnější elektrický náboj je záporný, čímž dosahují své výhradní propustnosti pro kladné ionty. S výjimkou Ca²⁺ selektivních TRPV5 a TRPV6 jsou neselektivní. Každá ze čtyř podjednotek, jež tvoří výsledný kationtový transmembránový kanál, sestává ze šesti transmembránových helixů. Její N- i C-koncové domény a motivy specifické pro jednotlivé podrodiny jsou vystaveny do

intracelulárního prostředí. Samotný kanál je zformován s pomocí smyček mezi 5. a 6. segmentem každé podjednotky. Obě skupiny těchto receptorů se odlišují svými sekvencemi a posttranslačními modifikacemi především na svých koncových doménách (Clapham, 2003). V rámci první skupiny jsou rozdíly zejména v množství ankyrinových repetitiv na N konci. Členové druhé skupiny nemají na svém C konci konzervovanou TRP doménu. Strukturní vlastnosti umožňují rodině TRP receptorů reagovat na poměrně široké spektrum stimulů, jednotlivé receptory často samy bývají multimodální. Většinou jsou schopny v rámci rodiny tvořit heterotetramerní komplexy.

První zástupce TRP receptorů byl objeven již v roce 1969 u *Drosophila melanogaster*, savčí mutanty se objevily až později v sedmdesátých letech. Každá z nich je popsána podle jejich typických agonistů či dle efektu, který zprostředkovávají. Na nocicepci se z této rodiny podílejí především kanály TRPV1, TRPV4, TRPA1 a TRPM8 (Moore *et al.*, 2018).

2.4.1 CHARAKTERISTIKA TRPV1 RECEPTORU

Vaniloidní receptor (TRPV1, či VR1) je polymodální senzorický receptor, který na molekulární úrovni tvoří především homotetramerní neselektivní kationtové kanály s vyšší propustností pro dvoumocné kationty, obzvláště pro vápenaté ionty. Každá ze čtyř subjednotek je tvořena šesti helikálními transmembránovými segmenty a mezi 5. a 6. helixem má amfipatickou část, jež se podílí na formování samotného kanálu (Clapham, 2003; Messeguer, Planells-cases a Ferrer-montiel, 2006).

TRPV1 receptor byl funkčně popsán v roce 1997 (Caterina *et al.*, 1997), jako první z rodiny TRP receptorů a je také nejpodrobněji zkoumaný. Existuje řada způsobů jeho aktivace, počínaje zvýšenou hladinou volných protonů, tedy nízkým pH (pod 5,9), zvýšenou teplotou (>43°C), nefyziologicky velkou depolarizací, či vazbou lipidických endogenních či exogenních agonistů jako **alicin**, **anandamid**, **cinnamodial**, **kanabidiol**, **kapsaicin**, **leukotrien B4**, **N-oleoyldopamin** či **resiniferatoxin** (Pedersen, Owsianik a Nilius, 2005; Fenwick *et al.*, 2017). Mezi ligandy působící na tento receptor antagonisticky patří **acetylsalicylová kyselina**, **agatoxin** či synteticky vytvořené sloučeniny jako **AMG-517**, **carsazepin**, **SB366791** a **yohimbin** (Jardín *et al.*, 2017). TRPV1 může být senzitivizován fosforylací působením následujících

intracelulárních enzymů-kináz či molekul druhých poslů - PKA, PKC, MAPK, PI3K, NGF, PLA2 (Moore *et al.*, 2018). Tyto fosforylace mohou cílit na odlišné části receptoru, což se může projevit rozdílným působením na tento receptor. Například fosforylace prostřednictvím PKC senzitivizuje TRPV1, ale není schopna jeho aktivace a otevření samotného receptorového kanálu (Bhave *et al.*, 2003).

Experimentálně dobře využitelným poznatkem je existence specifických agonistů VR1, kapsaicinu a resiniferatoxinu, které neinteragují s ostatními členy subrodiny vaniloidních receptorů. Podle Pedersena to platí i pro nízké pH (mezi 4 a 5) (2005). Kapsaicin je přirozeně obsažený v chilli papričkách rodu *Capsicum* v koncentracích závislých na konkrétním druhu. Molekuly kapsaicinu při konzumaci ostrých pokrmů difundují skrz membránu buňky na intracelulární vazebné místo TRPV1 receptoru pro vaniloidy. Tím tyto kanály na volných nervových zakončeních v ústech aktivují, spustí vtok vápenatých a sodných iontů do zasažených buněk, kde depolarizací spustí přenos akčních potenciálů skrz trigeminální nervovou dráhu a my po zpracování souvisejících informací v mozku pocítíme pálivý vjem (Caterina *et al.*, 1997; Caterina, 2000). Pro určení pálivosti, resp. koncentrace kapsaicinu používají prodejci výrobků z chilli papriček subjektivní Scovilleho stupnici pálivosti udávající takové ředění extraktu (v jednotkách SHU), při kterém již nepocítíme pálivost kapsaicinu.

Expresí 1. typu vaniloidních receptorů byla pozorována u mnoha druhů organismů včetně ptáků a *caenorhabditis e.* či *drosophila sp.*, ale pouze u savců se vyvinula jejich schopnost spouštět nociceptivní signalizaci v reakci na aplikaci kapsaicinu. Rostliny obsahující kapsaicin tak využívají insenzitivitu ptáků vůči kapsaicinu k šíření vlastních semen prostřednictvím ptačího trusu (Jordt a Julius, 2002). TRPV1 receptory jsou pojmenovány podle jejich původních agonistů, vaniloidních sloučenin, mezi které patří v případě V1 receptoru kromě vanilinu i výše zmíněný kapsaicin či resiniferatoxin. Jednotlivé vaniloidní receptory se liší lokalizací a senzitivitou ke konkrétním vaniloidům (Szallasi, 1994).

2.4.2 EXPRESE TRPV1

Exprese TRPV1 probíhá u savců především na primárních senzoryckých neuronech malé a střední velikosti, které jsou zapojené v nociceptivní signalizaci a produkují také různé nociceptivně specifické molekuly jako substance P či CGRP. Molekuly těchto receptorů se nacházejí na periferních zakončeních DRG neuronů i na tělech a centrálních výběžcích těchto neuronů a neuronů trigeminálních ganglií (Caterina a Julius, 2001; Li, Adamek, *et al.*, 2015). Exprese tohoto receptoru probíhá v omezené míře i v mozku, především v dorzální části hypotalamu a dle některých prací i v hipokampu (Cavanaugh, Chesler, Jackson, *et al.*, 2011; Hurtado-Zavala *et al.*, 2017). S jistotou se ovšem nachází ve viscerálním systému. V pankreatu se účastní výlevu substance P a na periferních výběžcích DRG inervujících orgány trávicího traktu (tlusté střevo, dvanáctník, pankreas, žaludek, žlučník) jsou TRPV1 receptory odpovědné za vznik bolesti při zánětech těchto orgánů (Beyak a Vanner, 2005). U pacientů s idiopatickými střevními záněty se na periferním zakončení primárních neuronů zvyšuje jejich množství v souvislosti s rozvětvením terminál dotčeného nervu (Yiangou *et al.*, 2001). U nemocných s rektální hypersenzitivitou koreluje míra zvýšení TRPV1 exprese v dotčené oblasti střeva s úrovní pozorované hypersenzitivity (Chan *et al.*, 2003).

2.4.3 FUNKCE TRPV1 V NERVOVÉ SOUSTAVĚ

Tyto kationtové kanály slouží především na periferních výběžcích primárních senzoryckých neuronů jako detektor prozánětlivých faktorů, sníženého pH, teplot vyšších než 43 °C či přítomnosti specifických chemických sloučenin. Při splnění některé z výše uvedených podmínek se zvyšuje podíl aktivních TRPV1 receptorů a při působení nějakého TRPV1 modulátoru i senzitivita těchto receptorů k dalším agonistům. TRPV1 transportují především kladně nabitě vápenaté ionty do intracelulárního prostředí a řádová změna koncentrace těchto iontů spustí škálu navazujících intracelulárních reakcí. Při překonání prahové hodnoty napětí, -40 mV, způsobí vtok sodných iontů prostřednictvím napěťově řízených sodných kanálů a vede k depolarizaci, tvorbě akčního potenciálu a transdukci signálu dál po příslušné nociceptivní dráze (Jardín *et al.*, 2017).

Svou funkci má TRPV1 nejen v periferních, ale i v centrálních zakončeních senzorických neuronů. Centrální funkce není tak podrobně prozkoumána, ale jeho aktivita se projevuje ve zvýšené míře při neuroinflamačních podmínkách. Špicarová a Paleček pozorovali na míšních řezech potkanů zvýšení senzitivity TRPV1 receptoru vůči endogennímu agonistovi OLDA (N-oleoyldopamin) na modelu neuroinflamace indukované působením TNF α na míšní neurony. Tato senzitivizace způsobuje snadnější aktivaci nociceptivní signalizace a vznik bolestivého stavu (Spicarova a Palecek, 2010). Význam TRPV1 ve zvyšování senzitivity organismu po jeho poškození byl pozorován i po operačním zákroku na chodidle potkana, který byl použit k vytvoření modelu termální i mechanické hypersenzitivity a mechanické allodynie. Po jediné aplikaci intratekálně injikovaného antagonisty TRPV1 receptorů, SB366791, byly omezeny behaviorální projevy termální hyperalgie a úplně potlačena byla mechanická allodynie, ovšem bez ovlivnění mechanické hyperalgie. Podobného výsledku bylo dosaženo i při lokální intradermální aplikaci tohoto antagonisty v blízkosti operovaného místa. Autoři tak ukázali, že na vzniku stavů zvýšené citlivosti po chirurgickém zákroku se podílí jak periferní, tak i centrální populace TRPV1 receptorů primárních senzorických nociceptivních neuronů (Uchytlova, Spicarova a Palecek, 2014).

V dřívějších pracích nepotvrzená exprese TRPV1 v hipokampu (Cavanaugh, Chesler, Jackson, *et al.*, 2011) byla po několika letech pozorována Hurtadou a kol. Podle nich je v interneuronech vrstvy oriens-lacunosum moleculare hipokampu lokalizovaná populace TRPV1, která podporuje synaptogenezi zvyšováním počtu lokálních glutamatergických excitačních terminál, čímž se ve specifické populaci neuronů podílí na hipokampální plasticitě (Hurtado-Zavala *et al.*, 2017).

2.5 Toll-like receptory

Toll-like receptory jsou rodina integrálních membránových receptorů 1. typu rozpoznávajících specifické molekulární vzory (PRR). Zaprvé rozlišují struktury související s výskytem různých patogenních částic či organismů v těle, tzv. PAMP (pathogen associated molecular patterns) a zadruhé tzv. DAMP (damage-associated molecular patterns), buněčné fragmenty a látky unikající do okolí při poškození některé buňky. U savců byla potvrzena exprese jedenácti zástupců Toll-like rodiny, TLR1 až TLR11. U člověka ovšem exprese TLR11 nebyla pozorována (Sasaki *et al.*,

2009; Salem *et al.*, 2017). Jako první byl izolován Toll-like receptor 4 v roce 1997 (O'Neill, Golenbock a Bowie, 2013). Tomu ovšem předcházela u modelového organismu *Drosophila melanogaster* desetiletí práce s jejich příbuzným genem Toll, jemuž byla přisouzena funkce v tělesném vývoji. Svou ventrálně lokalizovanou expresí vede ve spolupráci s homeoboxovými geny k určení dorzoventrální osy prostřednictvím mechanismu imunitně řízené programované buněčné smrti. U obratlovců se TLR receptory částečně také podílejí na vývoji, především na diferenciaci linií buněk nervové soustavy. Například na míře exprese TLR2 závisí specializace buňky v neuron či astrocyt a na expresi TLR4 záleží výsledný poměr neuronálních a gliových buněk. Zatím ovšem nebylo zjištěno, které endogenní ligandy k těmto účelům receptory využívají (Anthoney, Foldi a Hidalgo, 2018).

2.5.1 OBECNÁ STRUKTURA TLR

Rodina Toll-like receptorů jsou transmembránové proteiny s N-koncovou extracelulární doménou hákovitého tvaru, který je vytvářen mnoha repeticemi bohatými na leucin (LRR). Obsahuje také domény obsahující mnoho cysteinu. Vazba některého z agonistů iniciuje dimerizaci, která u všech členů vytvoří strukturu ve tvaru „M“. Každý monomer má na intracelulárním C-konci jednu TIR (*Toll/interleukin-1 receptor homology*) doménu zajišťující při aktivaci interakci s adaptorovými molekulami (Jin a Lee, 2008b).

2.5.2 VLASTNOSTI TLR RECEPTORŮ

Většina Toll-like receptorů se nachází na vnější buněčné membráně, ale TLR8 a 9 se nacházejí výhradně v endozomálních váčcích. TLR3, 4 a 7 se v závislosti na typu a stavu buňky mohou nacházet jak na vnější membráně, tak v intracelulárních vezikulech (Liu, Gao a Ji, 2012).

Velká část členů této rodiny detekuje ve svém prostředí především přítomnost součástí bakteriálních buněk. TLR5 tak činí prostřednictvím flagelinu (Hayashi *et al.*, 2001), stavebního prvku prokaryotického bičíku, TLR1, 2 a 6 skrz exogenní lipoproteiny (Alexopoulou *et al.*, 2002; Godfroy *et al.*, 2012). V případě TLR3 je to siRNA (krátké interferující úseky RNA) a dvouvláknová RNA, u TLR7 a TLR8 jednovláknová RNA (Alexopoulou *et al.*, 2001; Vollmer *et al.*, 2005). TLR4 rozpoznává lipid A, součást lipopolysacharidu (LPS), stavebního prvku buněčné stěny

gramnegativních bakterií (Poltorak, 1998). Nemetylované CpG oligonukleotidy, dvouvláknové DNA segmenty bohaté na po sobě jdoucí dvojice CG párů, které jsou u savců vzácné, ale u bakterií celkem běžné, jsou zachycovány receptorem TLR9 (Vigilanti *et al.*, 2003). TLR10 je podle Marie Oostingové a kolektivu (Oosting *et al.*, 2014) první člen Toll-like rodiny s ryze protizánětlivými schopnostmi, jelikož inhibuje funkci MAPK dráhy a zároveň indukuje přes PI3K (fosfatidylinositol 3 kináza), AKT (protein kináza B) a I κ Ba (alfa inhibitor NF κ B) aktivaci koncové části NF κ B, což spouští expresi IL-1Ra (antigen receptoru pro Interleukin 1).

Monomery TLR receptorů spolu v případě navázání příslušného ligandu interagují a tvoří dimery, některé ve spolupráci s adaptorovými molekulami či koreceptory. Touto dimerizací dojde ke konformační změně, která přes transmembránové segmenty způsobí též dimerizaci intracelulárních C-koncových TIR domén nutnou pro aktivaci receptoru. Specifické proteiny, buď TIRAP (adaptorové proteiny TIR domény) a MyD88 (myeloidní diferenciací faktor), nebo TRIF (TLR-adaptorový interferon β indukující protein) a TRAM (adaptorová molekula příbuzná s TRIF), následně spouští další vnitrobuněčnou signalizaci prostřednictvím řetězce fosforylací a ubiquitinací, které umožní štěpení neaktivních forem dalších enzymů (Buchanan *et al.*, 2010).

Toll-like receptorové systémy jsou schopny spouštět jak nespecifickou, tak i specifickou neboli humorální imunitní odpověď a na zasaženém místě pak vzniká zánět. Některé receptorové molekuly jsou schopny tvořit heterodimery s jinými členy rodiny. Tyto komplexy pak mohou reagovat na jiné ligandy než v homodimerním stavu, což rozšíří spektrum látek, které spouští imunitní odpověď (Bagheri *et al.*, 2014; Oosting *et al.*, 2014).

2.6 TLR4 receptor

Metabotropní transmembránový Toll-like receptor 4 (TLR4) jako ostatní členové této rodiny rozpoznává specifické PAMP a DAMP. V případě navázání některé z těchto substancí také většinou dochází k dimerizaci a tvorbě receptorových komplexů aktivujících svými intracelulárními C-koncovými TIR doménami další vnitrobuněčnou signalizaci skrze specifické proteiny (Kim *et al.*, 2007). TLR4 receptor je významný především v iniciaci vrozené imunitní odpovědi na napadení gramnegativními bakteriemi, ale v rámci Toll-like rodiny je specifický svou schopností iniciovat oba typy

intracelulárních kaskád. Výběr kaskády závisí na jeho subcelulární lokalizaci. Na plazmatické membráně spouští přes faktor MyD88 a adaptorové proteiny TIRAP kaskádu vedoucí k produkci raných prozánětlivých faktorů genu NFκB. Ale po internalizaci do endozomálního váčku působí přes TRAM a TRIF adaptorové molekuly a spouští kaskádu IRF3 (interferon regulační faktor 3) vedoucí k produkci interferonů typu I (Kagan *et al.*, 2008; Buchanan *et al.*, 2010).

2.6.1 LIGANDY TLR4

Pro vazbu ligandů je nejdříve nutná interakce TLR4 s koreceptorem **MD-2** (lymfocytární antigen 96). Přirozenými, endogenními ligandy tohoto receptoru jsou různé fragmenty buněčné protoplazmy, které by se ve zdravém těle volně v extracelulárním prostoru neměly vyskytovat. Tak může buňka skrze TLR4 receptor detekovat poškození okolních buněk a spustit zánětlivé procesy. Mezi tyto posly buněčného poškození (DAMP) patří molekula ATP, proteiny teplotního šoku (HSP), nasycené mastné kyseliny a fragmenty heparansulfátu či kyseliny hyaluronové, nociceptin/orphanin FQ a řada dalších látek (J. Y. Lee *et al.*, 2001; Termeer *et al.*, 2002; Olson a Miller, 2004).

Exogenním ligandem TLR4 receptoru je prostřednictvím Lipidu A vázaná součást buněčné stěny gramnegativních bakterií, lipopolysacharid (**LPS**), působící jako agonista (Poltorak, 1998), a jeho různé varianty (mutantní LPS se zkrácenou částí Lipidu A či **LPS-RS** izolovaný z *Rhodobacter sphaeroides*), které působí jako antagonisté TLR4 receptoru (Hutchinson *et al.*, 2008; Jurga *et al.*, 2016). LPS-RS se ovšem v poslední době ukazuje být pouze druhově specifickým antagonistou TLR4. Funguje tak například na lidských buňkách a v myši, ale u koně a křečka působí jako agonista (Lohmann, 2003). Jeho vliv také závisí na konkrétním procesu, kterého se právě receptor TLR4 účastní. Podle Döringové (2017) může iniciovat tvorbu cytokinů a chemokinů přes TRIF kaskádu bez potřeby využití CD-14 molekuly. Může zároveň regulovat u mikroglíí jejich fagocytickou aktivitu způsobenou přítomností standardního LPS potlačováním tvorby MHC-1 glykoproteinu (Döring *et al.* 2017). Velmi čistý LPS-RSU se ovšem v poslední době ukázal na myším modelu SCI fungovat jako silně specifický antagonist TLR4 (Jurga *et al.*, 2018).

Existuje řada uměle syntetizovaných látek tvořených za účelem potlačování aktivace TLR4 receptoru, například **TAK-242 (resatorvid)**, která dovede procházet i skrz hematoencefalickou bariéru (Hua *et al.*, 2015), nebo látka s označením **FP-1** (Bettoni *et al.*, 2008). Jako antagonisté také působí tricyklická antidepresiva, opioidní látky naloxon a naltrexon, nebo **eritoran**, analog Lipidu A (Liu *et al.*, 2000).

Chemoterapeutikum **paclitaxel** působí vedle své původní funkce také jako agonista TLR4 receptoru. Paclitaxel je strukturně odlišný od klasického agonisty LPS a váže se na TLR4/MD-2 komplex jinak, konkrétně interakcí s fenylalaninem na pozici 126 v koreceptoru MD-2 (Resman *et al.*, 2014).

2.6.2 VÝSKYT TLR4 V NERVOVÉ SOUSTAVĚ

Exprese TLR4 receptorů probíhá na buněčné membráně neuronů a pravděpodobně i většiny druhů gliových buněk, včetně satelitních buněk (Buchanan *et al.*, 2010; Mitterreiter *et al.*, 2017). Zde je ovšem podle Tse a kol. jejich exprese potlačována v případě jejich přímého kontaktu s neurony (Tse *et al.*, 2014). V mikrogliích, hlavních imunitně aktivních gliových buňkách, jsou tyto receptory u zdravých jedinců částečně skladovány v intracelulárních vezikulech, odkud se mohou v případě potřeby sloučením vezikulu s cytoplasmatickou membránou buňky vystavit na její povrch (Bsibsi *et al.*, 2002). Na astrocytárních buňkách byla TLR4 exprese měřena především v mozku, ale ne v míše (Jou *et al.*, 2006; Gorina *et al.*, 2011) Exprese TLR4 v těchto buňkách v zadním míšním rohu tak dosud není jednoznačně určena (McCarthy *et al.*, 2017).

2.6.3 ÚLOHA TLR4 V NERVOVÉ SOUSTAVĚ

Na povrchu buněk nervové soustavy slouží tyto receptory jako detektory infekce gramnegativními bakteriemi nebo buněčného poškození v podobě fragmentů látek, jež se fyziologicky standardně nenacházejí v mezibuněčném prostoru. Při zachycení takových molekul aktivují jadernou expresi látek účastnících se v prozánětlivých obranných mechanismech (Li *et al.*, 2016).

Mechanismus aktivace TLR4 pomocí LPS je poměrně přesně známý. Když volná molekula **CD-14** v mezibuněčném prostoru objeví a naváže na sebe LPS, ukotví se na membránu buňky a po přiblížení ke komplexu **TLR4-MD-2** zprostředkuje jeho přenos.

Receptor poté dimerizuje a aktivují se jeho intracelulární TIR domény (Cao, Tanga a Deleo, 2009; Zanoni *et al.*, 2011). Prostřednictvím intracelulárních fosforylačních kaskád dojde k aktivaci exprese genů prozánětlivých faktorů (především $\text{TNF}\alpha$, a IL-1). Ty jsou vyplaveny do okolí a způsobí aktivaci příslušných imunitních buněk (Boeglin *et al.*, 2011). Humorální imunitní odpověď je mimo nervový systém spouštěna přímo aktivací TLR4 receptorů na imunitních buňkách (dendritické buňky, B lymfocyty, monocyty), jelikož i v nich probíhá exprese tohoto imunitně významného receptoru (Ogata *et al.*, 2000; Sabroe *et al.*, 2002; Varadaradjalou *et al.*, 2003).

Janova a kolektiv se blíže zaměřili na význam molekuly CD-14 pro funkci TLR4 receptoru a stanovili, že má tři hlavní role. Zaprvé vyhledáváním LPS ve svém solubilním stavu umožňuje ve srovnání s makrofágy v periférii zhruba stokrát vyšší senzitivitu vůči tomuto antigenu. Zadruhé s využitím tvorby interferonu β prostřednictvím TRIF dependentní kaskády TLR4 signalizace brání přehnané odpovědi na velký výskyt LPS. IFN β zde funguje jako zpětnovazebný protizánětlivý regulátor odpovědi organismu na bakteriální infekci. A zatřetí je nezbytný pro reakci mikrogliaálních buněk na molekuly DAMP (Jin a Lee, 2008a).

2.6.4 ÚLOHA TLR4 PŘI NEUROPATICKÝCH STAVECH

TLR4 receptor funguje jako zprostředkovatel působení paclitaxelu na nociceptivně specifické TRPV1 receptory na DRG a v míše. Vazba paclitaxelu aktivuje receptory TLR4, jimiž spouštěné kaskády vedou k senzitivizaci TRPV1 receptorů vůči aktivačním podnětům, a tím přispívají ke zvýšené nociceptivní signalizaci (Li, Adamek, *et al.*, 2015). Velmi čistý extrakt z bakterie *rhodobacter spheroidae*, LPS-RS Ultrapure byl recentně použit na modelu chronického přiškrcení sedacího nervu (CCI), kde způsobil zablokování aktivace TLR4, které vedlo k částečnému potlačení projevů vznikající neuropatie. Termální hypersenzitivita byla snížena zhruba o 20 % a mechanická o cca 25 % ve srovnání s kontrolními hodnotami. Především v extrahovaných DRG, ale i v lumbální míše byla po intratekálním podávání LPS-RSU pozorována antinociceptivní změna exprese prozánětlivých faktorů a například rovnováha mezi pronociceptivním IL-18 a antinociceptivním IL-18BP (vazebný protein pro IL-18) se posunula ve směru antinociceptivního prvku, tedy ke zdravé rovnováze, stejně jako poměr exprese MMP-9 (pronociceptivního) a TIMP-1 (Jurga *et al.*, 2018).

2.7 Gliové buňky

Hmotu centrální nervové soustavy tvoří kromě neuronálních buněk i buňky gliové, které mají řadu důležitých homeostatických a podpůrných funkcí. Gliové buňky početně představují dokonce kolem 70 % všech buněk v nervové soustavě. Patří mezi ně mikroglie a makroglie, které se rozlišují především na astrocyty a oligodendrocyty, k nimž se ještě přidávají Schwannovy buňky v periférii a satelitní buňky v gangliích. V mozku se nacházejí radiální buňky a specializované Bergmannovy buňky, respektive v oku Müllerovy buňky (Mika et al., 2013).

Astrocyty početně představují největší podíl mezi gliemi a jsou zásadní pro udržování homeostázy a výživy neuronů. Skrze své receptorové kanály a transportéry jsou schopny regulovat hladiny extracelulárních iontů, proteinů i neuropřenašečů, které dokonce mohou syntetizovat. Štěrbínovými spoji mezi sebou vytváří vodivě spojenou komunikační síť, jejímž prostřednictvím mohou snáze stabilizovat výkyvy prostředí okolních neuronálních buněk. Prostřednictvím GLT1 transportérů a glutamát–aspartátových transportérů (GLAST) jsou také schopny zpětného vychytávání glutamátu ze synapsí, který následně metabolizují na glutamin. Transportem do presynaptického neuronu potom recyklují tento přenašeč a výrazně tak urychlují regeneraci synapse pro nový komunikační cyklus. Astrocyty v mozku také prostřednictvím podocytů, svých výběžků napojených vzájemně těsnými spoji s okolními podocyty, obklopují mozkové kapiláry a utvářejí tak hematoencefalickou bariéru. Tím si zajišťují ultimátní kontrolu a přístup k látkám kolujícím uvnitř cév. Jsou ovšem také schopny produkce některých prozánětlivých faktorů (Ji, Berta a Nedergaard, 2013).

Mikroglie tvoří v normálních podmínkách maximálně 20 % z gliových buněk. V neaktivním stavu se volně pohybují napříč celým systémem a v případě detekce infekčních agens se aktivují, migrují k místu vzniku infekce a fungují jako imunitní fagocytující buňky (Mika et al., 2013).

Oligodendrocyty tvoří v CNS izolační myelinovou pochvu kolem mnoha vláken okolních neuronů, čímž zajišťuje jejich ochranu a urychlení signální funkce. Při zánětlivých reakcích a poškozeních nervového systému s výjimkou demyelinizačních poruch není jejich aktivita nijak výrazně ovlivněna.

2.7.1 ÚLOHA GLIOVÝCH BUNĚK V NEUROPATII

V poslední době se ukázalo, že především mikroglie a astrocyty mají vliv při vzniku a udržování neuropatických poruch. Po poranění nebo při dlouhodobém působení bolestivého stavu je ovlivněna aktivita těchto gliových buněk. V těchto stavech se hromaděním komunikačních a metabolických změn mohou podílet na tvorbě doprovodných symptomů typu nespavosti, deprese, nebo úzkosti (Dworkin *et al.*, 2010).

Při poranění nervové soustavy se do čtyřiaadvaceti hodin postupně začínají aktivovat mikroglální buňky, které produkují prozánětlivé mediátory (TNF α , IL-1 β). Astrocyty je následují v menším měřítku a až během tří dnů, ale jejich aktivace přetrvává dlouhou dobu, běžně i dvanáct týdnů. Aktivované astrocyty potom ve zvýšené míře produkují řadu dalších látek včetně NO (oxidu dusného), prostaglandinů, ATP, excitačních aminokyselin, ale také cytokinů (TNF α , IL-1 β) a chemokinů, které mohou napomoci tvorbě zánětu a také zprostředkovávají zvýšenou senzitivitu nociceptivních drah. Při zánětu přitom roste i míra exprese astrocytů, což lze pozorovat na množství jejich markeru, proteinu GFAP (Glial fibrillary acidic protein), který se mimo jiné podílí na reparativních procesech v nervové tkáni (Mika *et al.*, 2013; Ji, Xu a Gao, 2014).

2.7.2 NEUROINFLAMACE

Především aktivací mikroglálních buněk dochází lokálním místě poškození či infekce k procesu zvanému *neuroinflamace*. Můžeme ji srovnat se zánětem v jiné části těla, jelikož v aktivovaných mikroglích dochází k produkci prozánětlivých faktorů (chemokinů, prostaglandinů, cytokinů včetně TNF α , CCL2, IL-1 β , 2, 6, 10 a dalších látek), do oblasti zánětu migrují další imunitní buňky a v souvislosti s lokálními změnami prostředí se senzitivizují okolní nociceptory a vzniká zde ložisko bolesti. Pokud se v dostatečně krátké době neeliminuje zdroj infekce nebo v případě poškození nedokončí reparativní procesy, výrazně se změní morfologie a fyziologie zasaženého místa, což vede k přechodu bolestivého stavu do chronické podoby neuropatie (Colloca *et al.*, 2017).

Neuroinflamace má podle Joanny Mika a kol. v neuropatickém stavu velký význam při tvorbě hyperalgie. Mika a kol. na modelu chronické konstriktce míchy (CCI) měřili lokální zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů IL-1 β , 6 a 10. Následkem působení

aktivovaných gliových buněk se tak zvýšila senzitivita nociceptivních receptorů, která vedla k posíleným bolestivým projevům. Vzniklá hyperalgezie pak byla ve studii u potkanů potlačena podáváním kompetitivního interleukinu 1 α . Stejného efektu bylo dosaženo podáváním antagonisty receptoru pro IL-1 (Mika *et al.*, 2008).

Při poškození nervů se zvyšuje kromě produkce cytokinů a řady dalších prozánětlivých látek a též produkce chemokinů, které svým šířením z astrocytů a neuronů přispívají především k aktivitě okolních imunitních buněk. Prostřednictvím svých receptorů pro chemokiny může například chemokin CCL2 zvyšovat excitační synaptický přenos a vést tak i ke snižování prahu bolesti (Ji, Xu a Gao, 2014). Po zranění periferních nervů se aktivují i satelitní buňky v DRG a Schwannovy buňky v míše. S jejich vlivem je spojena hypoxie v centrálním systému a neurodegenerace dotčených nervových buněk (Mika *et al.*, 2013).

2.7.3 MINOCYKLIN A JEHO PŮSOBNÍ

V rámci zkoumání vlivu gliových buněk na neuronální aktivitu bylo u potkaních buněk použito antibiotikum, které prokázalo svou roli při přechodném zablokování funkce mikroglálních buněk. Nazývá se minocyklin a je to širokospektré tetracyklinové antibiotikum, které může procházet hematoencefalickou bariérou a je používáno za účelem léčby různých onemocnění včetně bakteriální pneumonie nebo infekcí *Staphylococcus aureus* či bakteriemi rodu *Borrelia*, původci Lymeské boreliózy. Minocyklin potlačuje aktivaci jak mikroglálních, tak makrofágových buněk a zabraňuje tak vzniku neuroinflamace. Jeho vliv byl mimo jiné zkoumán na mladých potkanech, kterým bylo vytvářeno mechanické poškození mozku (Hanlon, Huh a Raghupathi, 2016).

Své uplatnění našel i ve viscerálních poruchách, jelikož při modelu viscerální bolesti u potkanů působil již do pěti minut po intratekální aplikaci analgetickým účinkem, ale neovlivňoval zdravé potkany (Kannampalli *et al.*, 2014). U neuropatického modelu vytvořeného selektivním podvazem míšních nervů potkana (SNL) bylo po vzniku mechanické allodynies každodenním podáváním minocyklinu dosaženo po čtrnácti dnech významného snížení této allodynies (Guasti *et al.*, 2009).

Nepřímý vliv minocyklinu na aktivitu Toll-like 4 receptorů byl ukázán na modelu hyperalgezie vytvořené intraperitoneální injekcí lipopolysacharidu. Takto aplikovaný

agonista TLR4 receptorů způsobil mohutnou imunitní odpověď v organismu zkoumaných potkanů, včetně mechanické a termální hyperalgezie. Podávání minocyklinu způsobilo potlačení všech behaviorálních změn způsobených LPS s výjimkou horečnatých teplot. Na základě rozboru exprese cytokinů bylo pozorováno, že jeho aplikací došlo k utlumení aktivovaných mikrogliálních buněk, na jejichž povrchu se nacházejí i TLR4 receptory. Bylo tak zabráněno tvorbě neuroinflamace v míše. Kromě toho minocyklin zablokoval aktivaci makrofágů v DRG, ale v tomto pokusu nebyla potlačena aktivita astrocytů ani satelitních buněk (Yoon, Patel a Dougherty, 2012).

3 Metodika

3.1 Cíle práce

V experimentální práci bylo cílem zjistit, zda mikrogliové buňky na míšní úrovni ovlivňují mechanismus přenosu nociceptivní informace a jestli potlačení jejich signalizace bude mít význam pro změny postsynaptické proudové aktivity míšních nociceptivních neuronů způsobené akutním podáváním paclitaxelu. Některé gliové buňky se podílejí na fyziologickém synaptickém přenosu na míšní úrovni, a proto bylo potřeba provést série kontrolních měření pro určení standardní aktivity při navrženém schématu pokusu. S touto kontrolou se pak mohly porovnávat případné odchylky aktivity postsynaptických proudů pozorované u ostatních skupin testovaných dle odpovídajících experimentálních protokolů.

První série experimentů byla změřena pro zodpovězení následujících otázek.

- 1) Jak se změní frekvence miniaturních excitačních postsynaptických proudů (mEPSC) měřená u neuronů I. a II. laminy zadního rohu míšního při opakované akutní aplikaci kapsaicinu?
- 2) Projeví se podávání paclitaxelu mezi aplikacemi kapsaicinu změnou frekvence či amplitudy těchto miniaturních excitačních proudů ve srovnání s první skupinou?
- 3) Bude mít podávání samotného minocyklinu vliv na změnu mEPSC vyvolanou kapsaicinem?

Pro zkoumání hlavního cíle byla další měření uspořádána do skupin odpovídajících na následující experimentální otázky:

- 4) Jak ovlivní souběžná akutní aplikace minocyklinu s paclitaxelem projevy tachyfylaxe TRPV1 receptorů během 2. odpovědi na kapsaicin?
- 5) Jak ovlivní odpovědi na kapsaicin a paclitaxel inkubace míšních řezů v minocyklinu před a během experimentu?

3.2 Pokusná zvířata

Všechny používané experimentální postupy a procedury byly schváleny komisí pro práci se zvířaty Fyziologického ústavu Akademie věd České republiky v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání 246/1992 Sb., ve znění pozdějších předpisů, v souladu s Evropskou směrnicí 86/609/EHS pro ochranu zvířat používaných na pokusné a jiné vědecké účely a v souladu s pravidly IASP pro práci s laboratorními zvířaty.

Experimentálním modelem použitým pro všechna měření v této práci byli samci laboratorních potkanů (*rattus norvegicus domesticus*) kmene *Wistar*, kteří dosáhli věku dvaceti až jednadvaceti postnatálních dní (P20-P21). Všechna zvířata byla do doby experimentu chována v kontrolovaných teplotních a světelných podmínkách s neustálým přístupem k potravě a vodě.

3.3 Použité chemikálie

Pro celkovou anestezii bylo použito anestetikum Isofluran, podávané inhalačně v 3% směsi se vzduchem, vytvořené ve vaporizéru Ohmeda Isotec 3 (BOC Healthcare, Velká Británie) při řízeném průtoku 1 l vzduchu za minutu po celou dobu operace.

K přípravě všech roztoků byla použita dvojnásobně destilovaná voda standardu a byla zajištěna kontrola osmolarity. Všechny roztoky, které přišly do kontaktu s míchou či jejími řezy, byly sycené karbogenem, plynou směsí 95 % O₂ a 5 % CO₂. Na jeden pokus většinou vystačil cca 1 litr disekčního ECS roztoku a 0,5 litru snímacího ECS roztoku (složení viz následující tabulka č. 1) obohaceného o všechny tři zvolené antagonisty (viz tabulka č. 2) a s vápenatými ionty z 1M zásobního roztoku CaCl₂ (Sigma-Aldrich spol s.r.o.). Oba extracelulární roztoky sloužící k vnějšímu oplachu a vyživování buněk byly připravovány do 5l zásobních lahví skladovaných v chladničce při 4°C. Intracelulární roztok s definovanou osmolaritou byl připravován pro dlouhodobější použití do aliquot uchovávaných v mrazáku při -20 °C. Po jeho namíchání dva dny probíhala stabilizace jeho pH, které se upravovalo dokapáváním hydroxidu cesného na výsledné pH 7,2.

Tabulka 1: Složení základních roztoků používaných při experimentech

Roztok	Použité látky	Koncentrace (mM)
<i>Roztok na agarový bloček</i>	NaCl KCl HEPES D-glukóza MgCl ₂ · 6H ₂ O CaCl ₂ · 2H ₂ O	160,00 2,50 10,00 10,00 5,00 0,50
<i>Disekční ECS (dECS, Sandkühler)</i>	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O NaHCO ₃ D-glukóza Sacharóza CaCl ₂ · 2H ₂ O	95,00 1,80 1,20 7,00 26,00 25,00 50,00 0,50
<i>Snímací ECS (sECS, Sandkühler)</i>	NaCl KCl KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ · 7H ₂ O NaHCO ₃ D-glukóza CaCl ₂ · 2H ₂ O	127,00 1,80 1,20 1,30 26,00 25,00 2,40
<i>Intracelulární roztok (pH 7,2)</i>	Glukonát draselný KCl EGTA HEPES MgCl ₂ · 6H ₂ O Na ₂ ATP NAGTP	120,00 20,00 0,50 20,00 2,00 2,00 0,50

Roztok chloridu vápenatého byl do snímacího roztoku přidáván až v den pokusu, aby nedošlo k nežádoucímu vysrážení vápníku a při tom bylo zároveň přidáno odpovídající množství antagonistů do finálních koncentrací, viz **tabulka 2** níže. Tito antagonisté sloužili k zablokování inhibičních glycinových (strychnin) a GABAergních (bikukulin) kanálů a také sodných kanálů umožňujících nadprahovou depolarizaci a tvorbu akčních potenciálů (tetrodotoxin). Tím byly při zvolené experimentální konfiguraci vytvořeny podmínky pro měření miniaturních postsynaptických proudových odpovědí (mEPSC) na presynaptické dráždění buněk napojených na snímanou buňku.

Tabulka 2: koncentrace antagonistů v sECS použitých pro měření mEPSC

Antagonista	Finální koncentrace (μM)
Bikukulin methiodid (Sigma-Aldrich)	10,0
Strychnin hydrochlorid (Sigma-Aldrich)	5,0
Tetrodotoxin citrát (Tocris/Biotrend)	0,5

K výrobě agarového bločku pro upevnění míchy byl použitý ECS roztok namíchaný podle složení v **tabulce 1**. Vzniklý 2% agar ohřátý ve vodní lázni byl nalitý do tloušťky 1 cm do petriho misky a po ztuhnutí uchovávaný v lednici do doby pokusu.

3.3.1 SPECIFIKA EXPERIMENTÁLNÍCH SKUPIN

Následující kapitola je věnována přípravě finálních roztoků používaných v jednotlivých experimentálních skupinách. Pro jejich přípravu byl použit syntetický kapsaicin zakoupený od výrobce Tocris Bioscience (Bio-Techne R&D Systems s.r.o.) v krystalické podobě, stejně jako cytostatikum paclitaxel. Minocyklin-hydrochlorid byl zakoupený v krystalické podobě od výrobce Sigma-Aldrich spol.s.r.o.

Pro všechny experimentální skupiny byl společný základ aplikačního roztoku kapsaicinu, který byl připraven spolu s ostatními speciálními roztoky během půlhodiny, kdy byly čerstvě nakrájené míšní řezy v regenerativní lázni. Po naplnění zásobníků snímacím ECS roztokem a odstranění vzduchových bublinek ze všech zaváděcích hadiček byl připraven **200nM** roztok kapsaicinu přidáním 2 μl rozmraženého 5mM zásobního roztoku kapsaicinu v DMSO do 50 ml snímacího ECS. Vzápětí proběhla i příprava roztoků paclitaxelu a minocyklinu v závislosti na konkrétním protokolu. Po dostatečné difuzi látek a zavedeném sycení byla malá část roztoků odpuštěna do odpadu, aby bylo zajištěno nahrazení čistého snímacího ECS přechodně vyplňujícího zaváděcí hadičky. Níže jsou popsána specifika při přípravě aplikačních roztoků pro jednotlivé experimentální protokoly vycházející ze stanovených pracovních cílů.

Protokol č.1 – „kontrolní“

K experimentu byly připraveny dva zásobníky, první obsahoval pouze roztok antagonistů ve snímacím ECS, druhý navíc obsahoval **200nM** kapsaicin. Druhý roztok jsme získali přidáním 2 μ l výše určeného zásobního roztoku kapsaicinu do 50 ml sECS.

Protokol č.2 – „akutní paclitaxel“

Kromě 2 roztoků z prvního protokolu byl připraven navíc třetí zásobník s roztokem **50nM** paclitaxelu připraveným přidáním 2 μ l zásobního 1,25mM paclitaxelu rozpuštěného v DMSO do 50 ml snímacího ECS roztoku s antagonisty.

Protokol č.3 – „akutní minocyklin“

Jako třetí roztok byl pro úsporu použité chemikálie připraven menší 25ml zásobník s 20 ml snímacího ECS, do kterého bylo přidáno 40 μ l zásobního 50mM roztoku minocyklinu rozpuštěného v ddH₂O. Toto množství odpovídalo jedné zásobní dávce. Výsledná koncentrace minocyklinu v roztoku byla **100 μ M**.

Protokol č.4 – „akutní minocyklin s paclitaxelem“

Pro sledování souběžné aplikace minocyklinu a paclitaxelu byl používán menší zásobník s roztokem minocyklinu ze třetího protokolu s přidáním paclitaxelem v množství 0,8 μ l pro dosažení 50nM koncentrace paclitaxelu používané ve všech konfiguracích.

Protokol č.5 – „inkubace v minocyklinu“

V každém experimentu v rámci tohoto protokolu bylo osm vybraných vizuálně použitelných míšních řezů hned po ukončení 30minutové regenerace v teplé lázni přeneseno do malé inkubační kádinky sycené karbogenem. Ta byla naplněna **100 μ M** roztokem minocyklinu ve 40 ml snímacího ECS s 2,4mM obsahem vápenatých iontů. Řezy byly v tomto roztoku následně minimálně 90 minut inkubovány. Poté byly jednotlivé řezy postupně odebírány k experimentálnímu měření.

V tomto protokolu byl ve všech roztocích používaných během experimentu přítomný minocyklin ve **20 μ M** koncentraci, která byla podle jiných prací dostačující pro zachování jeho působení na gliové buňky (Clark *et al.*, 2015). Roztoky pro tento protokol byly připravovány v půllitrové lahvi, do které bylo spolu s chloridem vápenatým, bikukulinem, strychninem a tetrodotoxinem rovnou přidáno i 200 μ l zásobního roztoku minocyklinu.

3.4 Aparatura a příslušenství

Experimentální aparatura sestávala především ze zesilovače Axopatch 1D (Axon Instruments, Inc., USA) napojeného přes analogově digitální převodník na osobní počítač vybavený softwarovým balíkem pClamp verze 10.5 (Axon Instruments, Inc. USA). Tím byly zaznamenávány měřené proudy. Měřicí komůrka s řezem se nacházela pod mikroskopem Zeiss Axio Examiner A.1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Německo), zespodu byl řez prosvícen zdrojem infračerveného záření o vlnové délce 850 nm, 5mm LED diodou IR850 (Hebei International Trading (Shanghai) Co., Ltd., Čína) a ke zobrazení neuronů byla využívána infračervená kamera (Point Grey Research Inc., Kanada) ve spojení se softwarem PixeLINK® Capture OEM 7.25 na displeji osobního počítače Hyundai Image Quest Q17 (Hyundai IT Corp., Jižní Korea). Pohyb snímací elektrody byl zajištěn upevněním na mikromanipulátoru MP-225 (Sutter Instrument Co., USA) a vnitřní přetlak vytvářela pumpa Tetrathec APS-300 (Tetra GmbH, Německo).

Experimentální roztoky byly aplikovány s využitím gravitačního spádu z vyrobených plastových zásobníků, do kterých byly zavedené silikonové hadičky s karbogenem. Přebytečný roztok byl z komůrky odsáván membránovou pumpou KNF N811 KT.18 (KNF Neuberger GmbH, Německo), aby byl udržovaný její minimální objem a tím zajištěno rychlé působení čerstvě přitékajícího média na řez.

Celá snímací aparatura byla umístěna ve Faradayově kleci a mikroskop s příslušenstvím byl pro minimalizaci otřesů postaven na antivibračním stole M-I-G-30X36-2 (Newport, USA).

3.5 Příprava akutních míšních řezů

K experimentům bylo potřeba získat 300 μ m tenké transversální řezy lumbální oblasti míchy s vitálními neurony, proto byl čas nutný k odběru tkáně potřeba zkrátit na minimum. Samcům potkanů kmene *Wistar* byl při celkové isofluranové inhalační anestezii odebírán takový úsek míchy, aby obsahoval celou neporušenou lumbální oblast. Zvířata byla operována z dorzální strany. Po oholení srsti, odstranění kůže a šetrném odstříhu podélných páteřních svalů od samotné páteře byla provedena akutní laminektomie. Mícha byla odkrývána opatrným odstřiháváním dorzální části míšního kanálu s pomocí zahnutých nůžek již od linie spojující hrbolky pánevních kostí v oblasti *cauda equina* až po rostrální část hrudníku. Následně byly v co nejkratším čase

přerušeny míšní kořeny a takto extrahovaná mícha byla ponořena do disekčního extracelulárního roztoku chlazeného kvůli zpomalení ischemických procesů ledovou lázní na teplotu maximálně 4°C. Odtud byla po odstranění zbývajících míšních kořenů a krevních sraženin vložena kvůli mechanické fixaci tkáně do žlábků mezi dva tenké agarové bločky nalepené sekundovým lepidlem na kovovou podložku vibračního kráječe. Celá destička byla okamžitě poté ponořena do karbogenem syčeného disekčního roztoku v komůrce vibračního kráječe Leica VT1200S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Německo), na kterém byla fixovaná mícha pomocí safírového nože nakrájena na příslušné řezy.

Nůž v rovině řezu ve směru kolmém k posunu vibroval frekvencí 85 Hz ($\pm 10\%$) v rozsahu 2,5 mm a rychlost posunu ostří skrz řez byla velmi pomalá (0,06 mm/s), aby se minimalizovalo poškození neuronů. Vznikající řezy byly ihned po oddělení přenášeny do disekčního roztoku vyhřívaného ve vodní lázni Memmert-WB7 (Memmert GmbH, Německo) a syčeného karbogenem, aby se zde případné poškozené buňky při teplotě 35 °C mohly za 30 minut zregenerovat. Takto připravené řezy pak byly přeneseny do snímacího roztoku o pokojové teplotě, ve kterém vydržely vitální v závislosti na kvalitě a rychlosti provedení všech předcházejících kroků po dobu 6 až 8 hodin. Řezy pak již byly jednotlivě podle potřeby přenášeny k použití v pokusu do komůrky snímací aparatury, která měla zajištěný stabilní přívod čerstvého snímacího roztoku o pokojové teplotě a přibližném průtoku 2 ml/min. Aktuálně používaný řez byl stabilizován pod několika paralelními silonovými vlákny nataženými mezi rameny malé platinové podkovičky v takových vzdálenostech, aby bylo minimalizováno riziko poškození struktury řezu v měřeném místě a jeho okolí.

3.6 Zhotovení skleněných snímacích mikroelektrod

Pro intracelulární snímání byly používány tenkostěnné borosilikátové kapiláry (Rückl Glass a.s., Česká republika), ze kterých byly na tahači Pipette Puller model P-97 (Sutter Instrument Co., USA) s využitím tříkrokového ohřevu připravovány elektrody s hrotovým průměrem kolem 1 μm . Hotové elektrody byly naplněny zhruba 2 μl připraveného intracelulárního roztoku injekční stříkačkou s pomocí tenké špičky Microloader (Eppendorf Czech & Slovakia s.r.o., Česká republika) připevněné na jejím konci. Používané elektrody po napojení do elektrického obvodu nahrávací aparatury vykazovaly při konstantním přetlaku odpor mezi 3,0 M Ω a 7,0 M Ω .

3.7 Elektrofyziologické měření

Metoda terčíkového zámku (*patch clamp*) slouží ke studiu elektrických projevů živých buněk *in vitro*, v měřítku jednotlivých buněk a jejich původních fyziologických synaptických spojení nebo jen v části jejich buněčné membrány. Využívá přitom parametry fyzikálního modelu buněčné membrány jako vodiče s proměnlivou mírou vodivosti (podle aktuálního stavu propustnosti transmembránových kanálů) a se silnými kapacitními vlastnostmi, které jí umožňují udržet rozdíl elektrického náboje mezi prostředím, které odděluje, i v řádech desítek milivoltů.

Kvalitního kontaktu skleněné mikroelektrody s buňkou při patch clampu může být dosaženo díky přirozené přilnavosti lipidické buněčné membrány k čistému sklu. Ta je ještě posílena drobným podtlakem vytvářeným ústy, který je během odpojování přetlakové pumpy udržován. Pumpa do té doby tvoří před špičkou kapiláry malý proud intracelulárního roztoku vytlačovaného přetlakem z kapiláry. Tento proud při přibližování k cílové buňce pomáhá odplavit zbytky mezibuněčné hmoty a poškozených buněk a ochraňuje špičku mikrokapiláry od kontaktu s nežádoucím znečištěním. Také umožňuje snazší napojení elektrody na cílový neuron. Při dostatečně šetrném přístupu se podaří vytvořit tzv. gigaseal (odpor na elektrodě v řádech GΩ), který je znakem dobře těsnícího spojení elektrody s membránou buňky. V praxi tím je dosaženo minimalizace elektrického šumu způsobeného potenciálním vytékáním roztoku přímo skrz netěsnící spojení elektrody s buňkou do jejich okolí. Tato výchozí konfigurace se nazývá „cell-attached“ a umožňuje snímat aktivitu malé části membrány při zachování komplexity buňky.

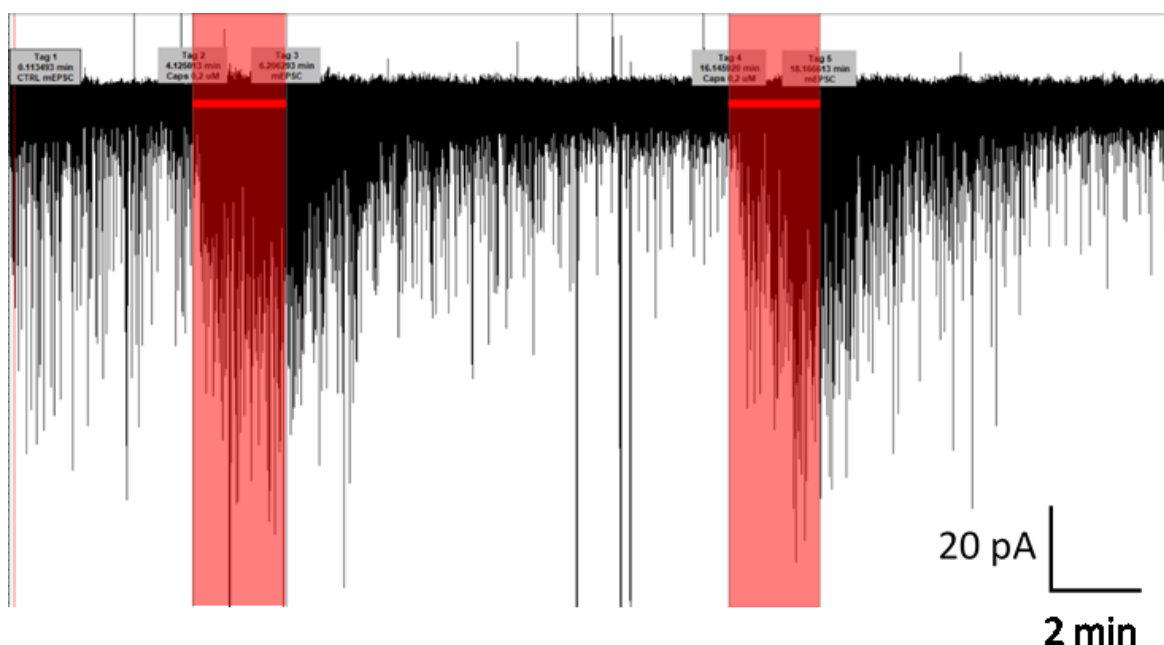
V těchto experimentech byla použita konfigurace „*Whole-cell*“, k níž dospějeme protržením gigasealu jemným podtlakem. Tím spojíme vnitřní prostředí elektrody s vnitřním prostředím měřené buňky. Tato metoda umožňuje měřit souhrnně v celé buňce elektrické projevy působení experimentálních látek aplikovaných v extracelulárním roztoku na cílovou buňku a její povrchové receptory, jelikož je tento roztok v přímém kontaktu se všemi buňkami na povrchu řezu (vzhledem k probíhajícím difúzním dějům může částečně pronikat i dovnitř řezu), a může tak působit na jejich receptory zároveň. Životnost buněk měřených touto konfigurací může trvat i déle než 30 minut od vytvoření kontaktu.

V experimentech byly měřeny miniaturní excitační postsynaptické proudy (mEPSC) způsobené především vtokem sodných iontů skrz AMPA kanály do intracelulárního prostoru nociceptivně specifických superficiálních neuronů vnějších lamin (I. a II.) na dorzální straně lumbální části míchy. Příslušnost měřeného neuronu k nociceptivně specifické dráze byla rozlišována podle lokalizace konkrétní buňky a poté potvrzena pozorováním výrazného zvýšení její frekvence mEPSC při podání kapsaicinu, extraktu z chilli papriček. Kapsaicin působí jako specifický agonista TRPV1 receptorů, jejichž exprese byla pozorována na centrálních i periferních zakončeních nociceptivně specifických neuronů. Pro získání mEPSC bylo zapotřebí potlačit inhibiční proudy z okolních inhibičních interneuronů způsobované glycinergními a GABAergními kanály – k tomu byla využita stálá koncentrace blokátorů těchto kanálů, strychninu a bikukulinu, ve snímacích roztocích používaných při experimentech. Aby se zabránilo tvorbě akčních potenciálů, byl do snímacího ECS roztoku přidán ještě blokátor napěťových sodných kanálů, tetrodotoxin.

Na řezu byl vyhledán vhodně lokalizovaný superficiální neuron střední velikosti, kapilára naplněná intracelulárním roztokem byla upevněna na mikromanipulačním zařízení s hrotem v rovině neuronu, který byl působením přetlaku jemně očišťován od zbytků mezibuněčné hmoty. Po úspěšném provedení výše popsání gigasealu a protržení membrány do konfigurace „Whole-cell“ byly bez dlouhého prodlení nastaveny parametry měřícího zařízení tak, aby byly elektrické vlastnosti buňky vhodně vykompenzovány. V tu chvíli byl spuštěn záznam a dále bylo postupováno podle konkrétního protokolu.

3.7.1 PARAMETRY EXPERIMENTÁLNÍCH PROTOKOLŮ

Každý úspěšný experiment musel trvat minimálně 21 minut, stabilnější buňky byly pro případnou budoucí potřebu nahrávány i delší dobu. Pro většinu protokolů bylo společné základní časové schéma. První čtyři minuty byla měřena základní aktivita frekvence miniaturních postsynaptických excitačních proudů (mEPSC). Poté byl dvě minuty aplikován roztok obohacený o 200nM kapsaicin. Následoval úsek deseti minut, ve kterém se aktivita mEPSC mohla vracet do původního stavu při aplikaci kontrolního roztoku (sECS se všemi třemi antagonisty), nebo byly aplikovány specifické experimentální látky s potenciálním vlivem na podobu následující odpovědi na druhou aplikaci kapsaicinu. Od šestnácté minuty záznamu, respektive přesně po deseti minutách od konce první aplikace, byl znovu po dvě minuty aplikován roztok s kapsaicinem a poté byla v každém z protokolů alespoň tři minuty sledována doznívající druhá odpověď na kapsaicin, který byl vymýván kontrolním roztokem. Ve všech roztocích byla obsažena stejná koncentrace všech tří antagonistů, jak je popsáno v kapitole ‚Použité chemikálie‘. Dále jsou popsány specifické úpravy v aplikovaných roztocích a ve schématu protokolů jednotlivých experimentálních skupin.

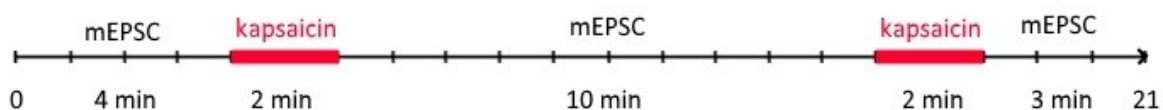


Obrázek 2: Ukázka kompletního záznamu (zde 26minutového) jedné z buněk kontrolní skupiny. Specifické odchylky směřující od izoelektrické linie dolů představují jednotlivé události – miniaturní postsynaptické excitační proudy ionotropních glutamátergních AMPA kanálů. Při tomto zvětšení jsou proudy patrné jen jako tenké úsečky o různé délce.

Zvýrazněny jsou dvě dvouminutové oblasti, kdy byl aplikován kapsaicin. I na první pohled je viditelná zvýšená postsynaptická aktivita AMPA kanálů během obou aplikací tohoto silného agonisty presynaptických TRPV1 kanálů, která odeznívá ještě několik dalších minut.

Protokol č. 1 – „kontrolní“

V prvním experimentu byla provedena základní podoba experimentu pouze s opakovanou aplikací **200nM** kapsaicinu pro zjištění průměrné frekvence a velikosti miniaturních proudových událostí (mEPSC) bez působení dalších vnějších vlivů.



Obrázek 3: Časový průběh 1. protokolu

Protokol č. 2 – „akutní paclitaxel“

Mezi aplikacemi kapsaicinu byl na míšni řez po celých deset minut aplikován **50nM** paclitaxel pro zjištění, zda bude mít chemoterapeutikum pozorovatelný vliv na změnu druhé odpovědi vzhledem ke kontrolnímu experimentu.



Obrázek 4: Časový průběh 2. protokolu

Protokol č. 3 – „akutní minocyklin“

Mezi aplikacemi kapsaicinu byl po deset minut akutně aplikován **100µM** roztok minocyklinu.



Obrázek 5: Časový průběh 3. protokolu

Protokol č. 4 – „akutní minocyklin s paclitaxelem“

Od konce první aplikace kapsaicinu byl deset minut aplikován roztok se **100 μ M** minocyklinem a zároveň s **50nM** paclitaxelem.



Obrázek 6: Časový průběh 4. protokolu

Protokol č. 5 – „inkubace v minocyklinu“

Před experimentálním měřením byl každý použitý řez inkubován minimálně 90 minut ve **100 μ M** roztoku minocyklinu bez přítomnosti antagonistů, pouze ve snímacím roztoku. Poté byl ve všech roztocích i před začátkem měření po celou dobu experimentu přítomný minocyklin ve **20 μ M** koncentraci. Mezi aplikacemi kapsaicinu byl podáván roztok s přidaným **50nM** paclitaxelem.



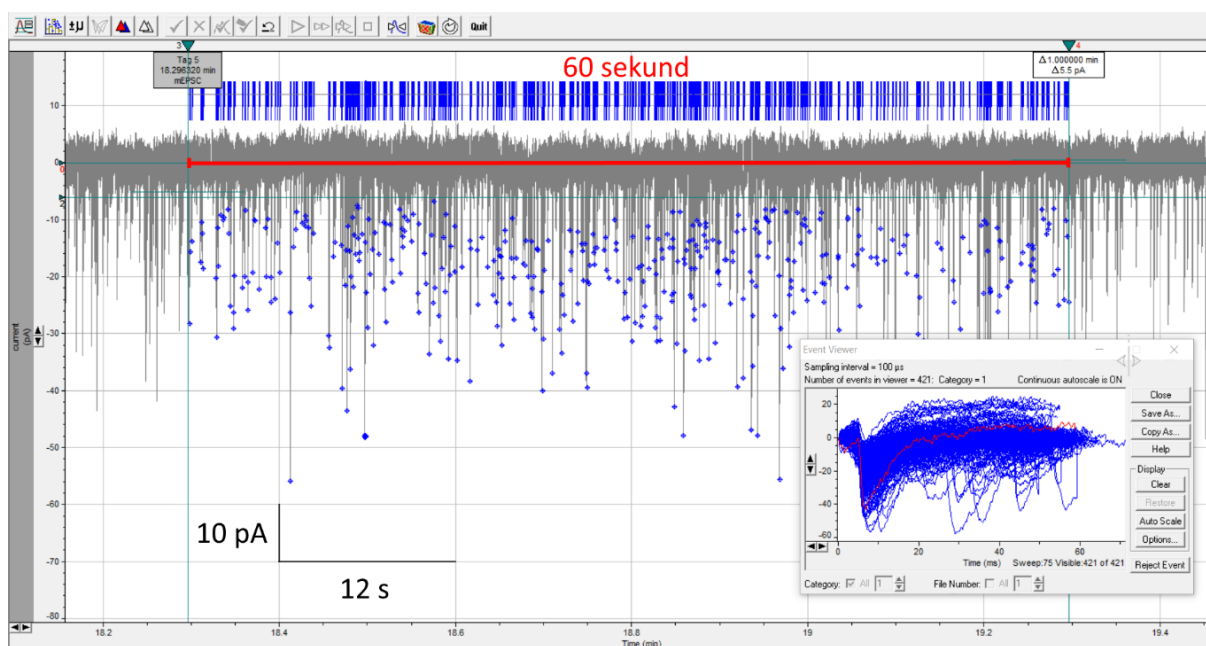
Obrázek 7: Časový průběh 5. protokolu

3.8 Vyhodnocení dat

Aplikace experimentálních roztoků a záznam miniaturních postsynaptických proudů proběhl podle výše popsanych protokolů a získaná data prošla primární vizuální kontrolou kvality záznamu. Během dalších dní proběhla analýza mEPSC. Byl odfiltrován šum s využitím Besselova lineárního analogového filtrování s horní prahovou hodnotou 900 Hz. Záznam byl poté pro usnadnění vyhodnocování manuálně vyrovnán upravením bazální linie a byla vyhodnocena frekvence a amplituda naměřených událostí.

Každou událost na záznamu představovala negativní proudová odchylka od bazální linie specifická ostrým nástupem, hrotem a mírnější návratovou křivkou (viz prohlížeč událostí vpravo na obrázku 8). Trvale aplikované inhibitory bránily vzniku inhibičních postsynaptických proudů (pozitivních odchylek od bazální linie) i standardních akčních potenciálů (násobně velkých událostí).

Dva minutové úseky vyhodnocované v každé odpovědi na aplikaci kapsaicinu byly určeny tak, aby zahrnovaly stěžejní oblasti těchto miniaturních proudových odpovědí a tak, aby byly vzájemně srovnatelné mezi jednotlivými měřeními. Pro analýzu všech mEPSC událostí byl stanoven dolní práh o velikosti 6 pA odpovídající zhruba dvojnásobku pozorované úrovně šumu. Vrchol amplitudy každé události musel být manuálně potvrzen (ukázka viz obrázek 8). Vše vycházelo z dřívějšího standardně využívaného způsobu vyhodnocování elektrofyziologických měření kolegů z laboratoře Funkční morfologie. Všechna vyhodnocování byla provedena v programu ClampFit 10.5 (Molecular Devices LLC, USA). Získané frekvence mEPSC byly uspořádány do skupin podle experimentálních protokolů a společně analyzovány jednofaktorovou rozptylovou analýzou (ANOVA) s Bonferroniho korekcí, v případě srovnávání dvojic výsledků byl použit párový test, u normalizovaných odpovědí jeho neparametrická podoba. Výsledky jsou prezentovány v další kapitole.



Obrázek 8: Ukázka právě vyhodnoceného 60sekundového úseku, který má počátek v 18. minutě a tvoří standardně druhou část analyzovaného úseku druhé odpovědi na kapsaicin. Prohlížeč událostí, okénko v pravé dolní části, ukazuje aktuální počet, amplitudu a průběh všech mEPSC událostí určených v hodnoceném úseku.

4 Výsledky

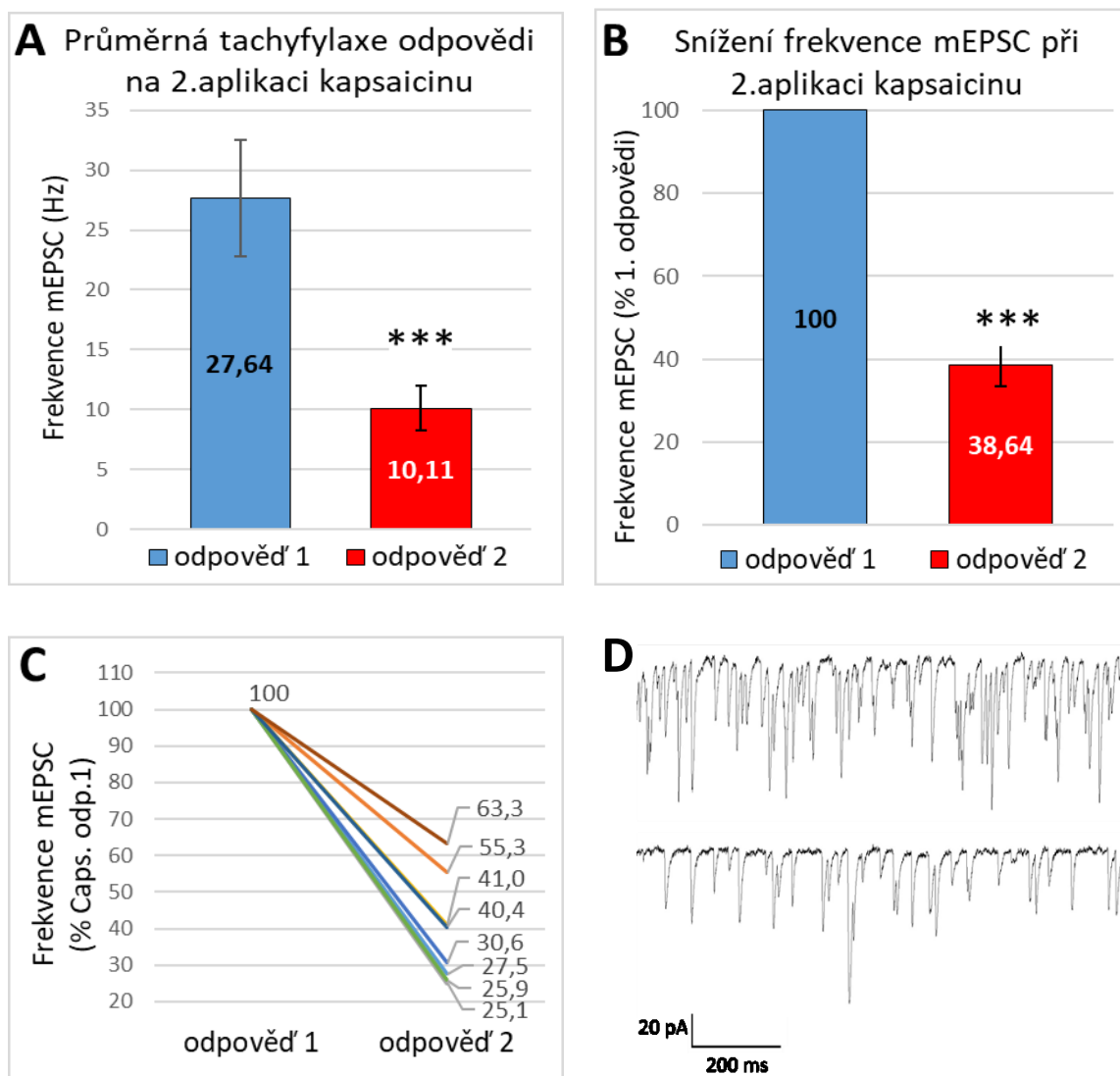
4.1 Vliv opakované aplikace kapsaicinu na frekvenci mEPSC

V první experimentální skupině byl testován vliv opakované aplikace 200nM koncentrace kapsaicinu na frekvenci mEPSC. Kapsaicin byl aplikován dvakrát po dvou minutách s deseti minutovým intervalem mezi aplikacemi. V této kontrolní skupině byla získána data z 8 superficiálních neuronálních buněk. Jejich průměrná počáteční spontánní frekvence mEPSC byla $1,34 \pm 0,25$ Hz. Ukázka záznamu jedné z těchto buněk je na obrázku č. 9 v části **D**. Na tomto obrázku se nachází grafická znázornění výsledků ze všech buněk kontrolní skupiny. Průměr odpovědi na první aplikaci kapsaicinu dosáhl frekvence mEPSC $27,64 \pm 4,82$ Hz. Ve druhé odpovědi došlo k významnému snížení na průměrných $10,11 \pm 1,89$ Hz, což po normalizaci první odpovědi na 100 % odpovídalo $38,64 \pm 5,05$ % první odpovědi. Amplitudy jednotlivých mEPSC událostí dosahovaly průměrně $23,89 \pm 3,97$ pA při první aplikaci kapsaicinu a $19,02 \pm 1,97$ pA při druhé aplikaci. Průměrné amplitudy obou odpovědí se významně nelišily mezi sebou, ani od průměrné amplitudy mEPSC událostí naměřených během počáteční spontánní aktivity, která byla u buněk kontrolní skupiny $21,94 \pm 2,23$ pA. Na společném grafu **C** na obrázku č. 9 je znázorněna úroveň tachyfylyxe kapsaicinu u všech buněk kontrolní skupiny. Všechny odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu jsou zde uvedeny v procentech odpovídajících normalizovaným hodnotám jejich první odpovědi.

4.2 Vliv aplikace paclitaxelu na tachyfylyxi odpovědi při opakované aplikaci kapsaicinu

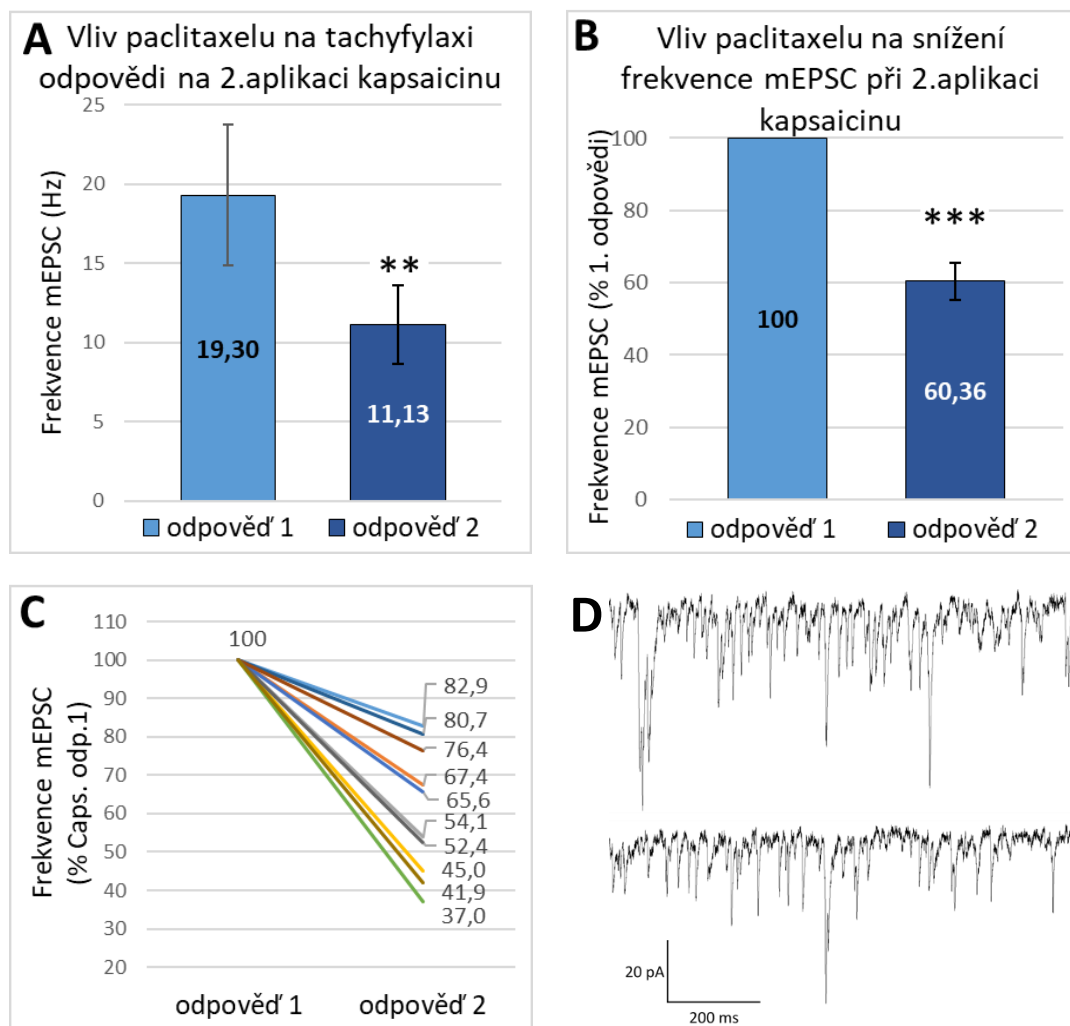
Ve druhé skupině byla v celém desetiminutovém intervalu mezi aplikacemi kapsaicinu aplikována nízká koncentrace paclitaxelu (50nM). Pro sledování vlivu paclitaxelu na tachyfylyxi kapsaicinu byla použita data z 10 buněk. Průměrná počáteční spontánní frekvence mEPSC těchto buněk byla $1,67 \pm 0,52$ Hz. Na obrázku č. 10 je na grafu **A** zobrazena průměrná frekvence mEPSC při první aplikaci kapsaicinu, která dosahovala $19,3 \pm 4,42$ Hz. Signifikantně nižší byla průměrná frekvence mEPSC druhé odpovědi, $11,13 \pm 2,45$ Hz. Po normalizaci první odpovědi se ve srovnání s kontrolní

skupinou jasněji ukázal vliv paclitaxelu na omezení tachyfylaxe, jelikož frekvence mEPSC při opakované aplikaci kapsaicinu dosahovala v průměru $60,36 \pm 5,25 \%$ odpovědi na jeho první aplikaci. Amplitudy mEPSC událostí při počáteční spontánní aktivitě byly v průměru $17,68 \pm 3,02 \text{ pA}$.



Obrázek 9: Skupina 1 – Vliv opakované aplikace kapsaicinu na frekvenci mEPSC superficiálních neuronů zadního míšního rohu. Graf **A** ukazuje průměrné frekvence mEPSC všech 8 buněk kontrolní skupiny. Odpovědi na první a druhou aplikaci kapsaicinu se vlivem tachyfylaxe signifikantně lišily. Na grafu **B** je vidět významné snížení frekvence mEPSC druhé odpovědi na kapsaicin po normalizaci 1. odpovědi na 100 %. Pro vyhodnocení frekvencí byl použit párový t-test, v případě normalizovaných hodnot neparametrický test. V částech **A** a **B** zobrazují chybové úsečky hodnoty střední chyby měření (S.E.M.); *** $P < 0,001$. (**C**) Třetí část zobrazuje pro srovnání normalizované míry

tachyfylaxe kapsaicinu všech buněk v kontrolní skupině. **(D)** Ukázka záznamu frekvence mEPSC jedné z kontrolních buněk. Horní záznam je úsek odpovědi při první aplikaci kapsaicinu a dolní záznam pochází z druhé odpovědi.

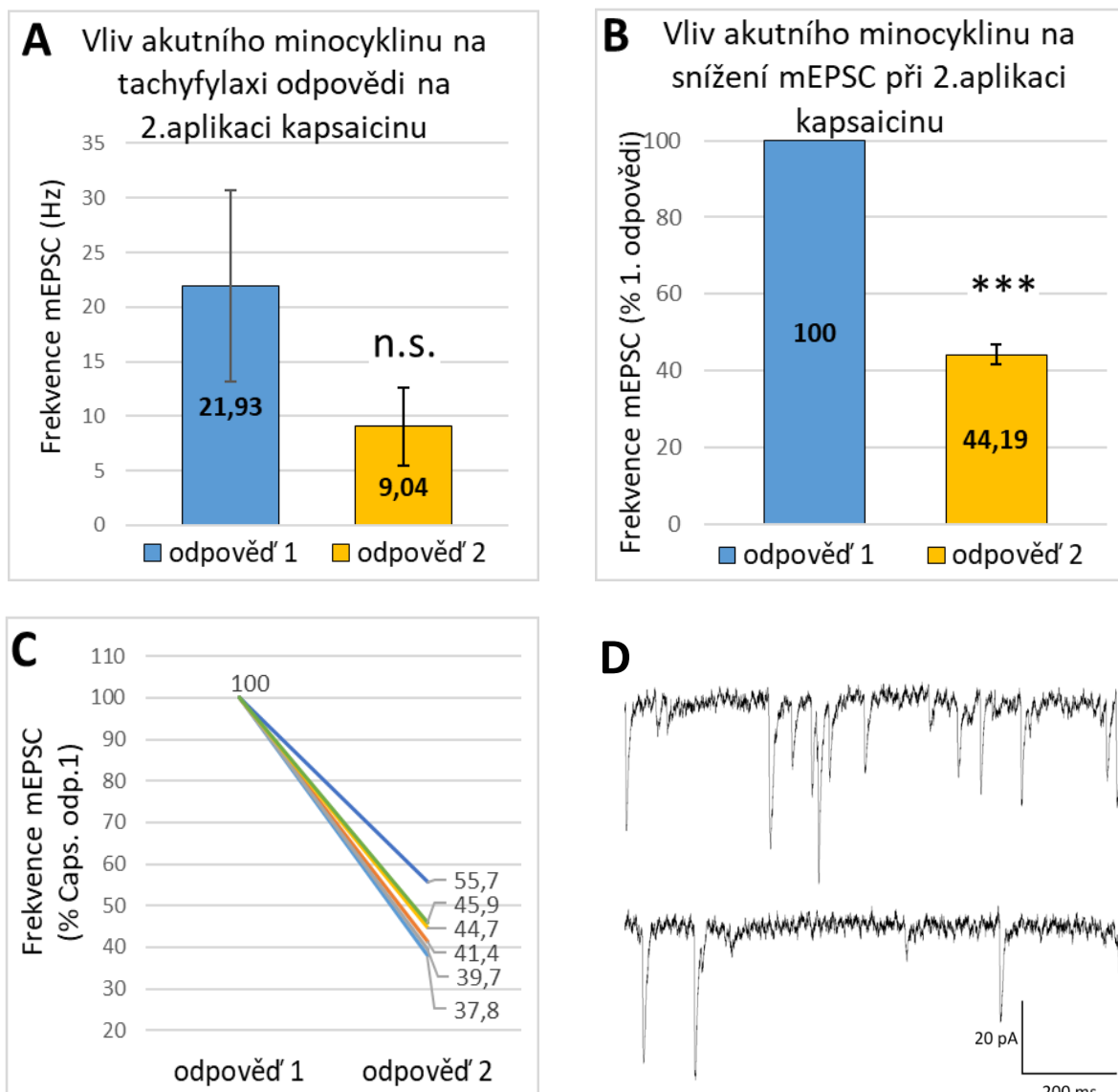


Obrázek 10: Skupina 2 – Vliv desetiminutové aplikace 50nM paclitaxelu na tachyfylaxi při opakované aplikaci kapsaicinu. (A) Průměrná frekvence mEPSC celé 2. skupiny při první aplikaci kapsaicinu a její významné snížení při opakované aplikaci kapsaicinu. **(B)** Průměrná frekvence mEPSC po aplikaci paclitaxelu v procentech normalizované odpovědi na první aplikaci kapsaicinu. K vyhodnocení rozdílu frekvencí mEPSC obou odpovědí byl využit párový t-test, u normalizovaných hodnot neparametrický test. Chybové úsečky znázorňují hodnoty střední chyby měření (S.E.M.); $**P < 0,01$; $***P < 0,001$. **(C)** Srovnání normalizovaných odpovědí na aplikaci kapsaicinu po působení paclitaxelu. **(D)** Zobrazení části jednoho záznamu aktivity z druhé skupiny. Horní úsek pochází z první odpovědi a dolní pochází z druhé odpovědi na aplikaci kapsaicinu.

Průměrné amplitudy při první odpovědi dosahovaly **$21,48 \pm 2,56$ pA** a při druhé odpovědi **$17,87 \pm 1,96$ pA**. Při použití párového t-testu mezi sebou průměrné amplitudy obou odpovědí vykazovaly signifikantní rozdíl; **$**P < 0,01$** . Vliv paclitaxelu na tachyfylaxi opakované odpovědi na kapsaicin u jednotlivých buněk je zobrazen v části **C** obrázku č. 10. V poslední části (**D**) je ukázka záznamu jedné z paclitaxelem ovlivněných buněk.

4.3 Vliv akutní aplikace minocyklinu na změnu frekvence mEPSC při opakované aplikaci kapsaicinu

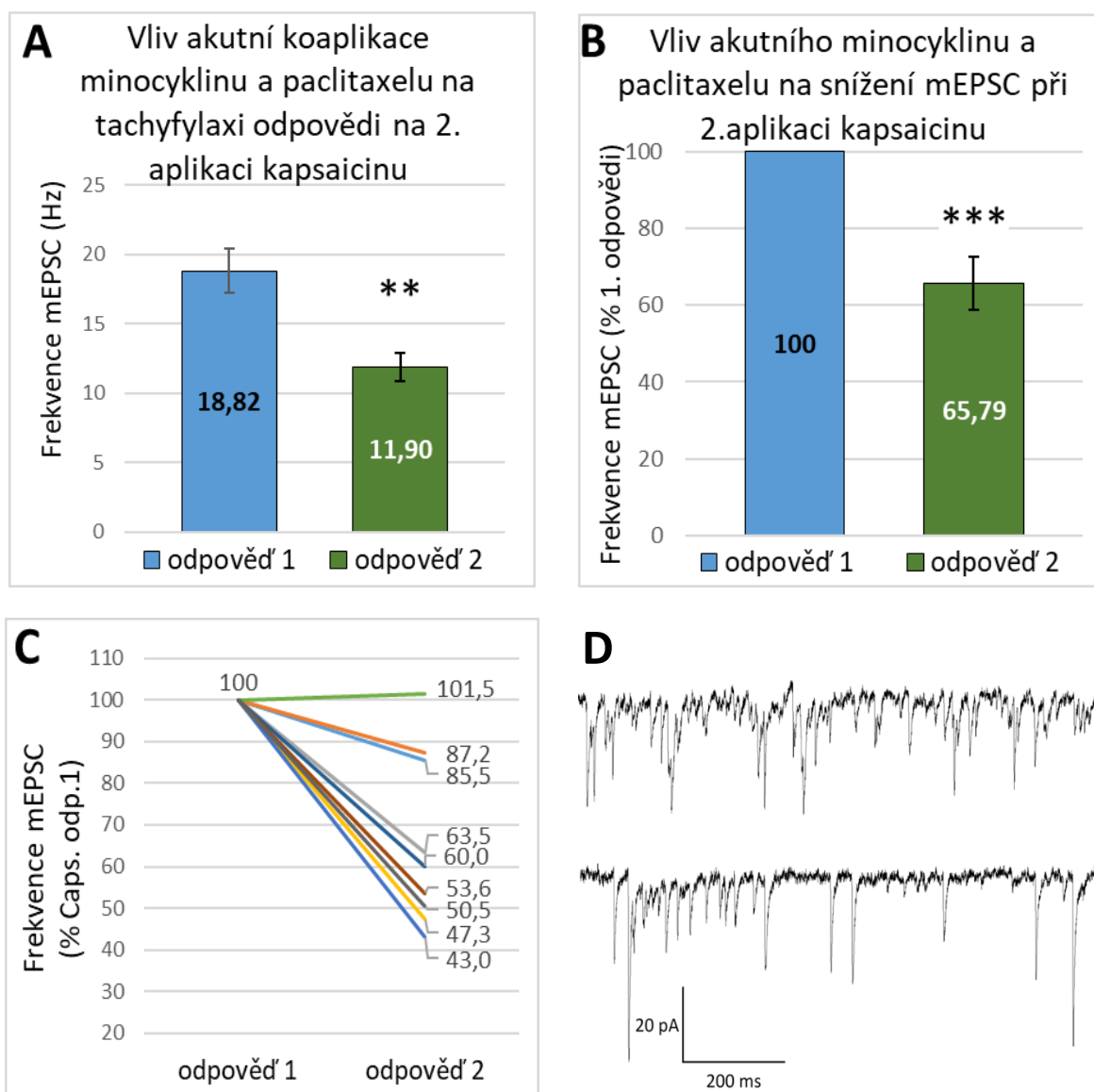
Ve třetí experimentální skupině byl sledován vliv akutní aplikace vysoké koncentrace minocyklinu ($100\mu\text{M}$) po dobu deseti minut mezi aplikacemi kapsaicinu na frekvenci mEPSC událostí při opakované aplikaci kapsaicinu. V této skupině byla získána data ze šesti buněk z různých míšních řezů, která jsou graficky znázorněna na obrázku č. 11. Jejich průměrná počáteční spontánní frekvence mEPSC byla **$1,56 \pm 0,29$ Hz** a průměrná amplituda počátečních spontánních mEPSC byla **$18,8 \pm 2,39$ pA**. Průměrná aktivita při první aplikaci kapsaicinu byla **$21,93 \pm 8,79$ Hz**, což nevyšlo signifikantně odlišné od frekvence mEPSC **$9,04 \pm 3,61$ Hz** při druhé aplikaci kapsaicinu (viz část **A** na obrázku č. 11). Po normalizaci první odpovědi všech buněk této skupiny na 100 % bylo zjištěno signifikantní snížení druhé odpovědi na průměrných **$44,19 \pm 2,61$ %** první odpovědi (obrázek 11, část **B**). Amplitudy mEPSC první odpovědi dosahovaly průměrně **$19,68 \pm 2,47$ pA** a u druhé odpovědi **$15,35 \pm 1,32$ pA**. Amplitudy mEPSC obou aplikací kapsaicinu se od sebe signifikantně nelišily. V části **C** obrázku č. 11 je společné grafické znázornění úrovně tachyfylaxe kapsaicinu u všech buněk třetí skupiny. Všechny odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu jsou zde uvedeny v procentech odpovídajících normalizovaným hodnotám jejich první odpovědi.



Obrázek 11: Skupina 3 – **Vliv akutně aplikovaného minocyklinu na tachyfylaxi kapsaicinu.** (A) Průměrné frekvence mEPSC během první a druhé aplikace kapsaicinu nebyly vlivem minocyklinu signifikantně odlišné; n.s. = není signifikantní. (B) Druhá odpověď na aplikaci kapsaicinu v procentech první odpovědi po její normalizaci vykazovala signifikantní snížení; *** $P < 0,001$. (C) Zobrazení tachyfylaxe všech šesti buněk ze skupiny s akutně aplikovaným 100 μM minocyklinem po normalizaci první odpovědi. (D) Ukázka záznamu mEPSC v průběhu aplikace kapsaicinu. K vyhodnocení rozdílu frekvencí mEPSC obou odpovědí byl využit párový t -test, u normalizovaných hodnot neparametrický test. Chybové úsečky znázorňují hodnoty střední chyby měření (S.E.M.).

4.4 Vliv akutní aplikace minocyklinu na působení paclitaxelu na tachyfylaxi při opakovaném podání kapsaicinu

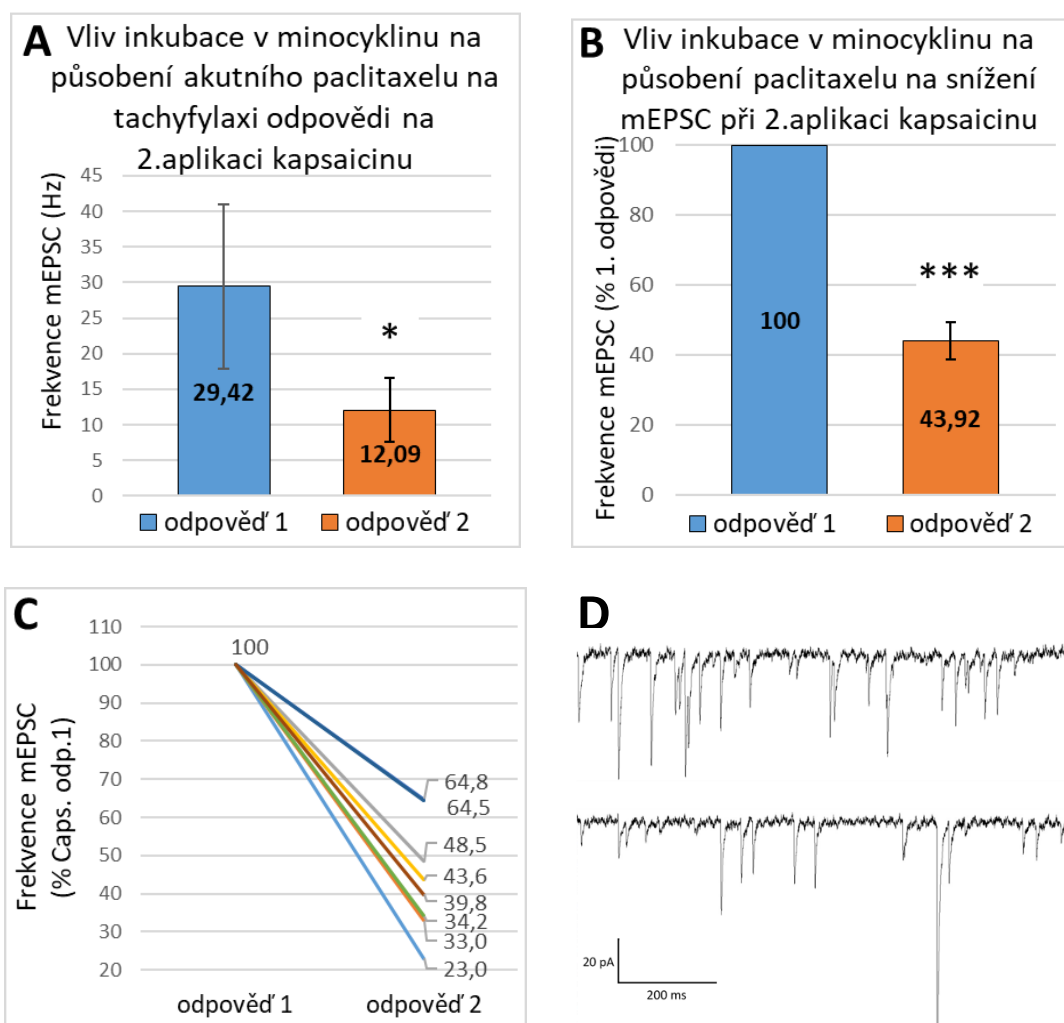
Ve čtvrté experimentální skupině byla mezi aplikacemi kapsaicinu deset minut aplikována vysoká koncentrace ($100\mu\text{M}$) minocyklinu zároveň s 50nM paclitaxelem. Tato skupina obsahovala celkem 9 buněk. Průměrná frekvence mEPSC ve skupině s akutně aplikovaným minocyklinem a paclitaxelem byla $0,74 \pm 0,26 \text{ Hz}$. Průměrná amplituda těchto událostí byla $18,80 \pm 2,39 \text{ pA}$. Výsledky této skupiny jsou zobrazeny na grafech obrázku č. 12. Na grafu **A** je skupinový průměr frekvence mEPSC první odpovědi na aplikaci kapsaicinu, který vycházel $18,82 \pm 1,56 \text{ Hz}$ a průměr odpovědi po akutní aplikaci minocyklinu a paclitaxelu, $11,9 \pm 1,02 \text{ Hz}$, který byl signifikantně nižší. Po normalizaci první odpovědi na 100 % dosahovala relativní frekvence mEPSC opakované odpovědi na kapsaicin $65,79 \pm 6,88 \%$ první odpovědi, jak je zobrazeno na grafu **B**. Průměrná amplituda první odpovědi vyšla na $18,23 \pm 1,55 \text{ pA}$ a u druhé odpovědi na $18,23 \pm 1,22 \text{ pA}$, což se od první odpovědi prakticky nelišilo. Ve třetí části (**C**) obrázku je znázorněna míra tachyfylaxe u každé buňky ve skupině s akutně aplikovaným minocyklinem a paclitaxelem po normalizaci první odpovědi. V poslední části obrázku č.12 jsou zobrazeny krátké úseky odpovědí na aplikaci kapsaicinu u jedné z buněk této skupiny.



Obrázek 12: **Skupina 4 – Vliv akutní aplikace minocyklinu a paclitaxelu na tachyfilaxi odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu.** (A) Srovnání průměrných hodnot absolutních frekvencí mEPSC při první aplikaci kapsaicinu a při jeho opakované aplikaci po působení minocyklinu a paclitaxelu. Při jejich srovnání byl s pomocí párového *t* testu ukázán signifikantní rozdíl; $**P < 0,01$. Na grafu B jsou průměrné hodnoty frekvencí mEPSC obou odpovědí po normalizaci první odpovědi, u nichž bylo také potvrzeno významné snížení druhé odpovědi; $***P < 0,001$. Třetí graf (C) zobrazuje tachyfylaxi odpovědi na kapsaicin po normalizaci první odpovědi u všech jednotlivých buněk ve skupině s akutně aplikovaným 100μM minocyklinem a 50nM paclitaxelem. Část D ukazuje v horní části krátký úsek první a v dolní části úsek druhé odpovědi na kapsaicin u jedné z buněk této skupiny.

4.5 Vliv inkubace v minocyklinu na působení akutní aplikace paclitaxelu na tachyfyaxi kapsaicinu

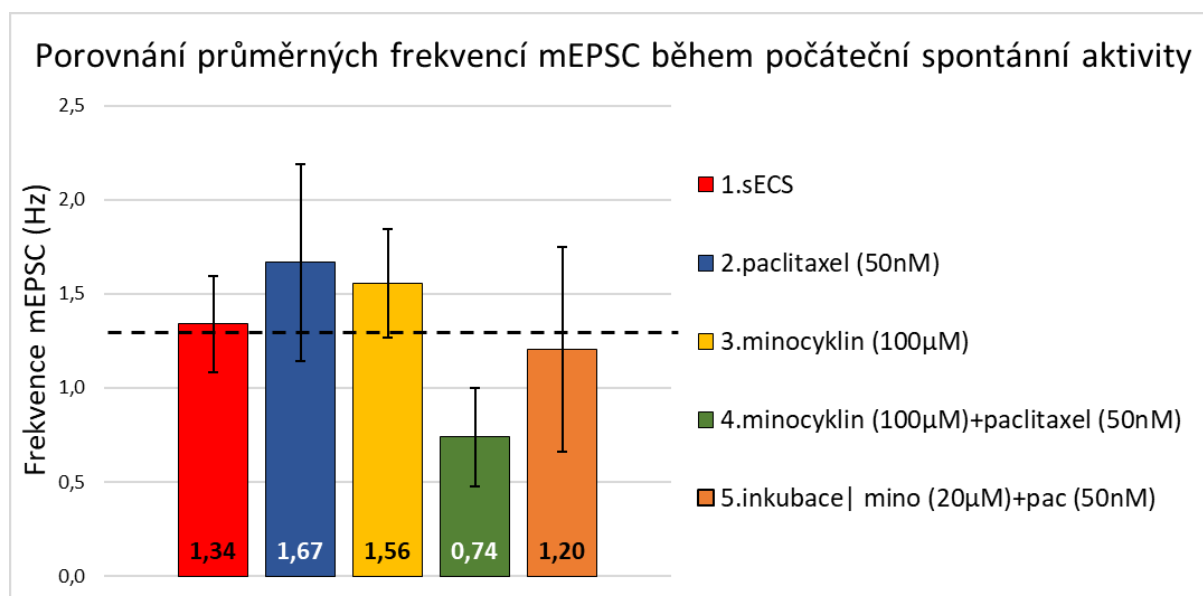
V této experimentální skupině byly míšňí řezy inkubovány v minocyklinu po dobu minimálně dvou hodin a následně byl aplikován minocyklin po celou dobu experimentu. Průměrná frekvence mEPSC všech 8 buněk po inkubaci v minocyklinu dosahovala **$1,20 \pm 0,54$ Hz** a amplituda byla **$22,09 \pm 2,8$ pA**. Na obrázku 13 v části **A** je znázornění průměrné frekvence mEPSC první odpovědi na aplikaci kapsaicinu, která byla **$29,42 \pm 11,54$ Hz** a u druhé odpovědi **$12,09 \pm 4,51$ Hz**. Průměrné snížení druhé odpovědi po aplikaci 50nM paclitaxelu a při stálé aplikaci 20 μ M minocyklinu dosahovalo **$43,92 \pm 5,25$ %** první odpovědi (viz obrázek 13, graf **B**). Mezi odpověďmi vycházel signifikantní rozdíl. Průměrné amplitudy první odpovědi, **$29,15 \pm 8,39$ pA**, a druhé odpovědi, **$23,54 \pm 1,55$ pA**, se od sebe významně nelišily. Třetí graf (**C**) představuje srovnání obou relativizovaných odpovědí na kapsaicin u všech buněk této skupiny. Záznamy v části **D** ukazují stejně dlouhé úseky měření během první odpovědi (horní) a druhé odpovědi (dolní).



Obrázek 13: Skupina 5 – Vliv inkubace v minocyklinu a následné akutní aplikace paclitaxelu i minocyklinu na tachyfilaxi odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu. Graf A ukazuje průměrné frekvence mEPSC všech 8 buněk skupiny řezů inkubovaných v minocyklinu. Odpovědi na první a druhou aplikaci kapsaicinu se vlivem tachyfylaxe signifikantně lišily. Na grafu B je vidět významné snížení frekvence mEPSC druhé odpovědi na kapsaicin po normalizaci 1. odpovědi na 100 %. Úroveň druhé odpovědi se po normalizaci nelišila od úrovně druhé odpovědi v kontrolní skupině. Pro vyhodnocení frekvencí mEPSC byl použit párový t-test, v případě normalizovaných hodnot neparametrický test. V částech A a B zobrazují chybové úsečky hodnoty střední chyby měření (S.E.M.); * $P < 0,05$; *** $P < 0,001$. (C) Třetí část zobrazuje pro srovnání normalizované míry tachyfylaxe kapsaicinu všech buněk v inkubované skupině. (D) Poslední část představuje záznam frekvence mEPSC při aplikaci kapsaicinu u jedné z buněk inkubovaných v minocyklinu. Horní záznam je úsek odpovědi při první aplikaci a dolní záznam pochází z druhé odpovědi.

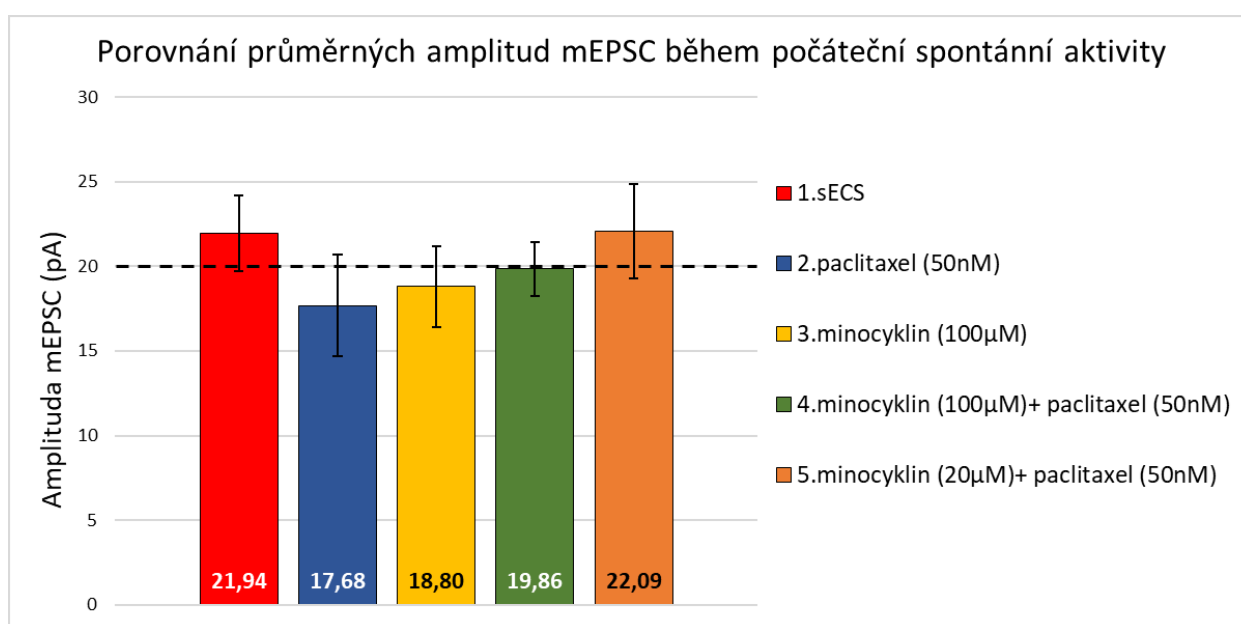
4.6 Porovnání výsledků všech experimentálních skupin

Na začátku každého experimentu byla natočena počáteční frekvence mEPSC jednotlivých neuronů (celkové $n = 41$). Při statistickém porovnání aktivit jednofaktorovou rozptylovou analýzou nebyl mezi jednotlivými experimentálními skupinami pozorován signifikantní rozdíl. Spontánní miniaturní aktivita se u většiny buněk pohybovala kolem 0,5 až 1,3 Hz. Průměrná frekvence mEPSC napříč všemi experimentálními skupinami se rovnala $1,29 \pm 0,18$ Hz a je znázorněna přerušovanou čarou na obrázku 14, kde je zobrazeno srovnání průměrných kontrolních frekvencí mEPSC. Vypočítané průměrné hodnoty jsou i ve všech následujících grafech rozděleny podle používaných experimentálních skupin.



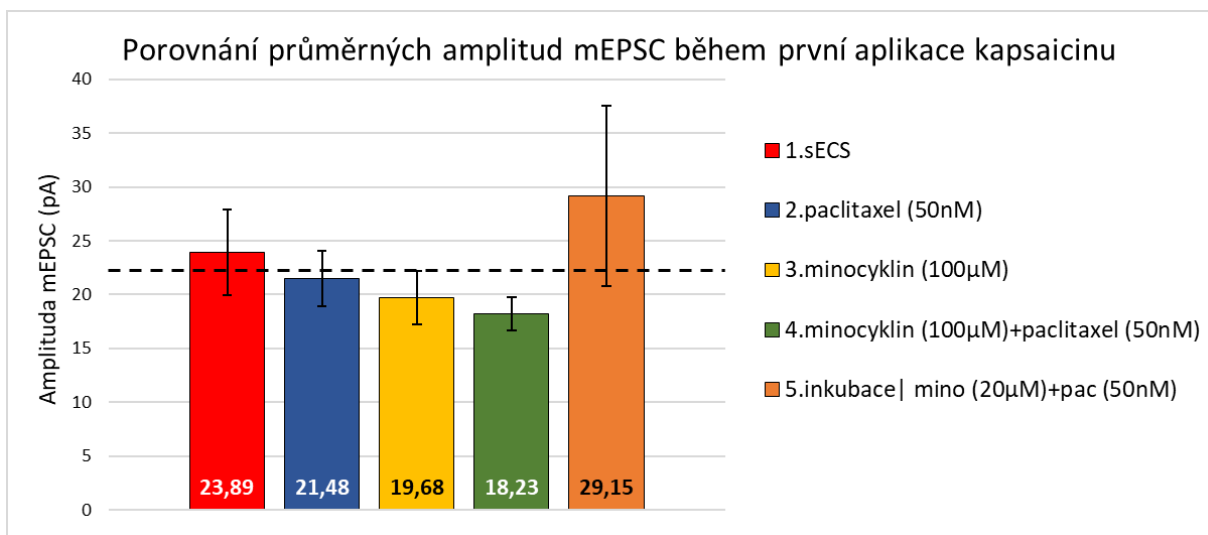
Obrázek 14: **Porovnání průměrných frekvencí mEPSC všech skupin před 1. aplikací kapsaicinu.** Žádné ze srovnávaných výsledků nevyšly signifikantně odlišné od ostatních. Přerušovanou čarou je na grafu zobrazena průměrná frekvence mEPSC ze všech skupin před aplikací kapsaicinu. Pro vyhodnocení statistiky byla použita jednofaktorová rozptylová analýza (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Chybové úsečky zobrazují střední chybu měření (S.E.M.).

Amplitudy mEPSC událostí snímaných před první aplikací kapsaicinu pro určení kontrolních hodnot (CTRL) se dle jednofaktorové analýzy rozptylu mezi jednotlivými experimentálními skupinami signifikantně nelišily. Průměrné hodnoty frekvence mEPSC rozdělené podle testovaných skupin jsou porovnány na obrázku 15. Výsledky byly získány z analýzy dvouminutového souvislého záznamu, konkrétně ze 3. a 4. minuty každé nahrávky. Celková průměrná velikost kontrolní amplitudy mEPSC událostí byla **20,01 ± 1,16 pA** a je na grafu znázorněna přerušovanou čarou. Absolutní velikost amplitud mEPSC se v průběhu pokusů u žádné experimentální skupiny signifikantně nezměnila (statistická data nejsou přiložena).



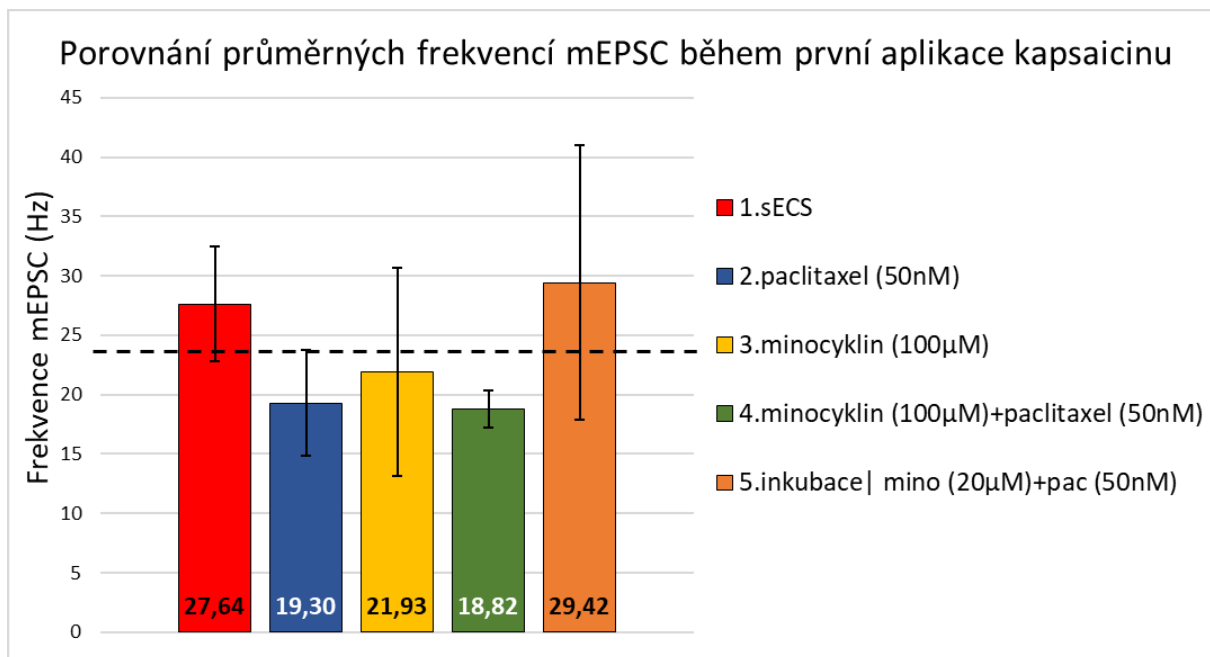
Obrázek 15: Porovnání průměrných amplitud mEPSC během úvodního měření před 1. aplikací kapsaicinu. Přerušovanou čarou je na grafu zobrazena průměrná amplituda všech odpovědí před první aplikací kapsaicinu. Pro vyhodnocení statistiky byla použita jednofaktorová rozptylová analýza (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Žádné ze srovnávaných výsledků nevyšly signifikantně odlišné od ostatních. Chybové úsečky zobrazují střední chybu měření (S.E.M.).

Amplitudy mEPSC událostí se od sebe stále signifikantně nelišily ani během odpovědi na první aplikaci kapsaicinu (viz obrázek 16); $P = 0,839$, i když pár poměrně aktivnějších, ale jinak standardních buněk v poslední skupině poměrně zvyšoval průměr celé skupiny. Průměrná velikost amplitudy mEPSC událostí ze všech měření při první odpovědi byla rovna $22,47 \pm 2,07$ pA (viz přerušovaná čára v grafu).



Obrázek 16: Porovnání průměrných velikostí mEPSC během odpovědi na první aplikaci kapsaicinu. Přerušovanou čarou je na grafu zobrazena průměrná amplituda všech odpovědí při první aplikaci kapsaicinu $22,47 \pm 2,07$ pA. Pro vyhodnocení statistiky byla použita jednofaktorová rozptylová analýza (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Žádné ze srovnávaných výsledků nevyšly signifikantně odlišné od ostatních. Chybové úsečky zobrazují střední chybu měření (S.E.M.).

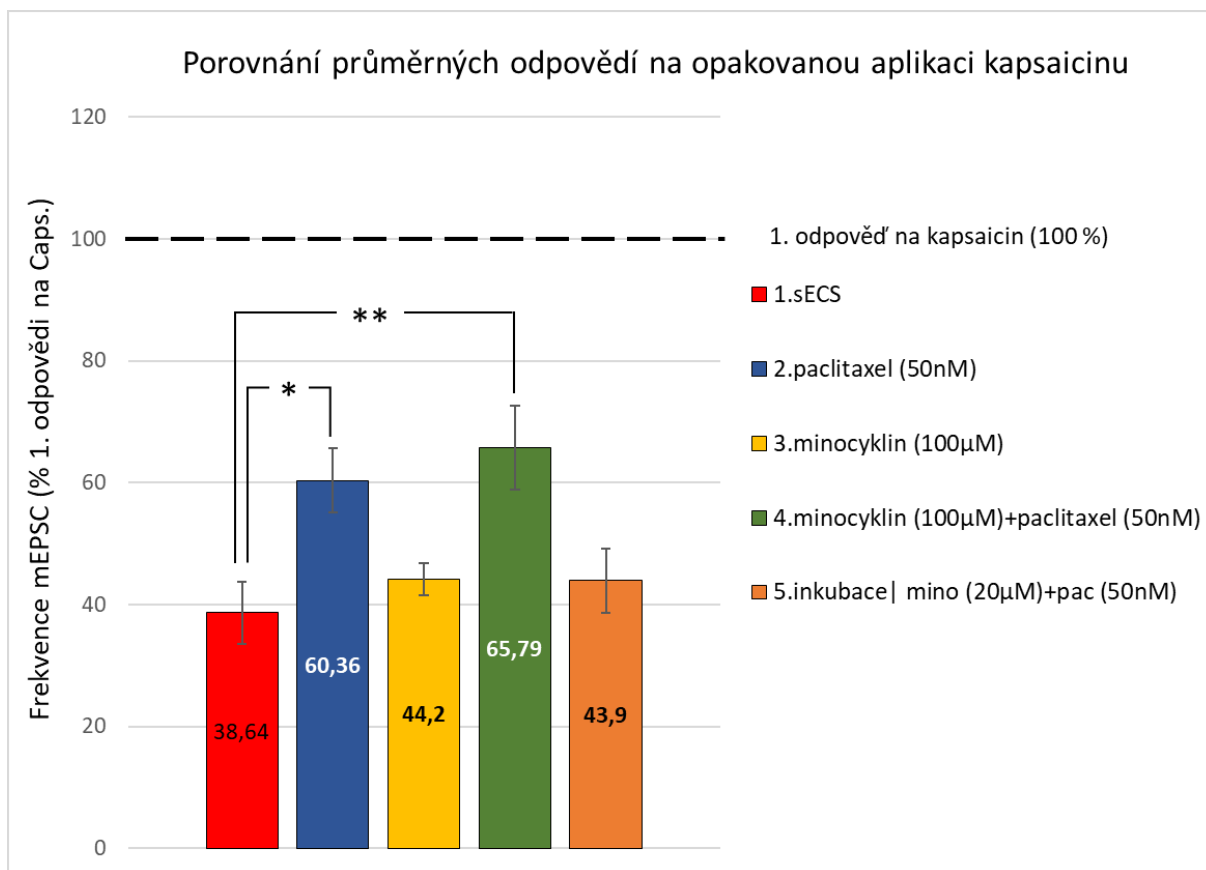
Při odpovědi na první aplikaci kapsaicinu nebyl mezi frekvencemi mEPSC žádný signifikantní rozdíl. Průměrná hodnota frekvence mEPSC, $23,18 \pm 2,87$ Hz, je znázorněna přerušovanou čarou na obrázku 17. Zvýšené hodnoty ve skupině inkubované v minocyklinu odpovídají mírně zvýšeným hodnotám amplitud v této skupině.



Obrázek 17: Průměrné frekvence mEPSC dosažené při první aplikaci kapsaicinu v jednotlivých experimentálních skupinách. Průměrné frekvence mEPSC druhé odpovědi (v % první odpovědi) se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišily. Pro vyhodnocení statistiky byla použita jednofaktorová rozptylová analýza (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Chybové úsečky zobrazují střední chybu měření (S.E.M.).

Obrázek 18 ukazuje průměrné odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu v procentech první odpovědi. V páté experimentální skupině byly na rozdíl od ostatních míšních řezy alespoň 90 minut před snímáním experimentálních mEPSC inkubovány ve 100 μ M roztoku minocyklinu v sECS. Ve srovnání s ostatními skupinami byl největší pokles druhé odpovědi v kontrolní skupině, jejíž průměrná odpověď dosahovala **38,64 \pm 5,05 %** první odpovědi. Třetí a pátá skupina dosahovaly podobného stupně tachyfylaxe s frekvencí o přibližně 5 % vyšší. Při akutním podávání 100 μ M minocyklinu tedy průměrná odpověď na druhou aplikaci kapsaicinu byla **44,2 \pm 2,61 %**. Po 90minutovém působení této koncentrace a následném stálém působení 20 μ M koncentrace minocyklinu byla i přes podávání paclitaxelu druhá odpověď v průměru **43,9 \pm 5,25 %**. Samotná aplikace 50nM paclitaxelu mezi podáváním kapsaicinu vedla k **60,36 \pm 5,25 %** druhé odpovědi na kapsaicin. V případě jeho akutní koaplikace s minocyklinem se druhá odpověď na kapsaicin výrazně nelišila od paclitaxelové skupiny a dosáhla v průměru na **65,79 \pm 6,88 %** první odpovědi.

Při srovnávání absolutních frekvencí mEPSC obou odpovědí na aplikaci kapsaicinu došlo u všech skupin k jejich signifikantně významnému snížení s výjimkou 3. skupiny, ve které byl mezi aplikacemi kapsaicinu v základním roztoku přítomný 100 μ M minocyklin. Při vizuálním srovnání průměrných frekvencí mEPSC první a druhé odpovědi bylo u druhé odpovědi též patrné snížení, ale při použití párového t-testu nevyšlo statisticky významně. Síla použitého testu (0,442) ovšem byla nižší, než by byla potřeba (0,800) ke spolehlivému odhalení skutečného vztahu. Bohužel se mi již nepodařilo zvýšit počet testovaných buněk v dané skupině, což by mohlo zvýšit sílu testu (data nejsou přiložena).



Obrázek 18: Průměrné frekvence mEPSC dosažené při druhé aplikaci kapsaicinu v jednotlivých experimentálních skupinách. Průměrná frekvence mEPSC druhé odpovědi (v % první odpovědi) byla při porovnání skupiny 1 (kontrolní měření) a 4 (po desetiminutovém působení minocyklinu s paclitaxelem) signifikantně odlišná; $**P < 0,01$. Mezi druhými odpověďmi kontrolní skupiny a skupiny 2 (po působení paclitaxelu) byl také naměřen signifikantní rozdíl; $*P < 0,05$. Pro vyhodnocení statistiky byla použita jednofaktorová rozptylová analýza (ANOVA) s Bonferroniho korekcí. Chybové úsečky zobrazují střední chybu měření (S.E.M.).

5 Diskuze

V této práci byla na neuronech zadního rohu míšního zkoumána modulace odpovědi na aplikaci kapsaicinu. Metodou terčíkového zámku byly snímány mEPSC vyvolané uvolňováním glutamátu z presynaptických zakončení DRG neuronů po aktivaci TRPV1 kapsaicinem. Takto vyvolané proudy byly modulovány aplikací paclitaxelu, minocyklinu a jejich kombinací. Získaná pozorování měla pomoci určit význam vlivu míšních gliových buněk na mEPSC aktivitu míšních nociceptivních neuronů *in vitro*. Součástí bylo i porovnání příslušné části výsledků získaných na potkanech s analogickými experimenty provedenými na myších.

5.1 Změna frekvence mEPSC po opakované aplikaci kapsaicinu

Centrální zakončení primárních senzorických neuronů zachovaná v akutním míšním řezu vytvářejí synapse se sekundárními neurony zadního rohu míšního. Aplikací kapsaicinu se aktivují TRPV1 receptory nacházející se na cytoplazmatických membránách centrálních zakončení. Aktivací těchto receptorů se způsobí depolarizace presynaptické membrány, vtok vápenatých iontů do tohoto zakončení a následný výlev exkrečních váčků obsahujících především molekuly glutamátu do synapse. Vazba takto uvolněného neuropřenašeče na postsynaptické receptorové kanály způsobí jejich otevření a vtok kladně nabitých, především sodných a draselných iontů dovnitř sekundárního neuronu, který je tímto depolarizován. Příslušnými postsynaptickými kanály jsou v konfiguraci snímající mEPSC, při napětí -70 mV a farmakologické blokaci inhibičních proudů, především glutamátové AMPA receptory.

Množství a velikost vzniklých proudových událostí pozorovaných postsynapticky závisí na koncentraci použitého kapsaicinu i na množství aktivovatelných TRPV1 receptorů na membráně příslušných DRG neuronů (Caterina *et al.*, 1997; Li, Adamek, *et al.*, 2015; Adamek, Heles a Palecek, 2019). Ke všem pokusům byla stabilně používána nízká, 200nM koncentrace kapsaicinu, takže proměnlivým prvkem zůstaly receptory, které se po interakci s agonistou přirozeně adaptují a dočasně se snižuje jejich odezva na další působení tohoto agonisty. Tento přechodný ochranný mechanismus brání trvalé aktivaci a excitotoxickému působení dlouhodobě zvýšené intracelulární koncentrace vápenatých iontů se nazývá *desenzitizace*. Ta nastává obecně změnou

počtu receptorových molekul na membráně nebo změnou jejich citlivosti vůči aplikovanému agonistovi (Touska *et al.*, 2011). Při měření mEPSC se mohou uplatňovat oba mechanismy. Během aplikace kapsaicinu ke snižování senzitivity TRPV1 přispívá především defosforylační modulace specifických aminokyselin jeho intracelulárních domén prostřednictvím enzymů s fosfatázovou aktivitou (Hung a Tan, 2018). Vlivem následujícího silného výlevu glutamátu dochází u postsynaptických AMPA receptorů především k jejich internalizaci. Postupný pokles frekvence mEPSC během první odpovědi je tedy způsobený nejen vymýváním kapsaicinu po konci jeho aplikace z roztoku, ve kterém je udržován snímaný neuron, ale zároveň i působením postupné desenzitizace. Frekvence mEPSC při druhé odpovědi, započaté s opakovanou aplikací kapsaicinu deset minut po konci jeho první aplikace, potom záleží na přetrvávající míře desenzitizace. Toto oslabení či vymizení účinku aplikované látky při její opakované aplikaci v krátkém intervalu poté nazýváme *tachyfylaxí* (Touska *et al.*, 2011).

Tachyfylaxe druhé odpovědi byla pozorována i v této práci při opakované experimentální aplikaci kapsaicinu na lumbální *in vitro* míšní řezy. Ve srovnání všech pěti experimentálních skupin se nejvýraznější snížení frekvence mEPSC projevilo za kontrolních podmínek. Desenzitizační mechanismy iniciované při první aplikaci tohoto agonisty TRPV1 receptorů tedy v základním experimentálním nastavení napodobujícím fyziologický stav přetrvaly. Působení kapsaicinu v průběhu měření neovlivnilo velikost amplitud mEPSC událostí, což odpovídá dřívějším výzkumům (Sikand a Premkumar, 2007). Podobná tachyfylaxe po aplikaci kapsaicinu byla při obdobné experimentální konfiguraci dříve pozorována u dospělých samců myší, kde byla normalizovaná odpověď na druhou aplikaci kapsaicinu rovna $32,6 \pm 6,0 \%$ první odpovědi (Li, Adamek, *et al.*, 2015), ve srovnání s průměrnými $38,64 \pm 5,05 \%$ první odpovědi v mojí práci provedené na potkanech.

5.2 Vliv paclitaxelu na tachyfylaxi při opakované aplikaci kapsaicinu

Aplikace paclitaxelu mezi aplikacemi kapsaicinu vedla u snímaných neuronů k signifikantnímu zvýšení frekvence mEPSC vzhledem k průměrným odpovědím na opakovanou aplikaci kapsaicinu v kontrolní skupině. Již dříve bylo prokázáno, že akutně aplikovaný paclitaxel senzitivizuje TRPV1 receptory, čímž zvyšuje frekvenci snímaných mEPSC (Li, Adamek, *et al.*, 2015). Paclitaxel tak působí proti efektu tachyfylaxe, ke kterému po aplikaci kapsaicinu přirozeně dochází. I v mé práci byla po deseti minutách působení paclitaxelu tachyfylaxe po aplikaci kapsaicinu částečně potlačena.

Ve výzkumu zaměřeném na zkoumání paclitaxelem navozené neuropatie prováděném kolegy z oddělení Funkční morfologie Fyziologického ústavu AV ČR v mezinárodní spolupráci se dvěma americkými laboratořemi se ovšem na myším modelu akutního působení paclitaxelu projevil výrazně vyšší vliv tohoto chemoterapeutika na potlačení tachyfylaxe kapsaicinu ve srovnání s výsledky této práce, jelikož frekvence mEPSC při druhé odpovědi na kapsaicin v paclitaxelem ovlivněných neuronech dosahovala $90,8 \pm 12,3 \%$ první odpovědi (Li, Adamek, *et al.*, 2015). V mé práci se obdobným protokolem řídila 2. experimentální skupina. U ní vedla akutní aplikace paclitaxelu k průměrným $60,36 \pm 5,25 \%$ mEPSC první odpovědi na kapsaicin (viz obrázek 10). Takto nižší odpověď by mohla vycházet z mezidruhového rozdílu v expresi proteinů u potkanů a myší. Potom by jen odlišným celkovým počtem zapojených receptorů i při zachování stejné konfigurace experimentů mohlo docházet k posunu rovnováhy mezi senzitivizačními a desenzitivizačními procesy, což by se projevilo slabším potlačením tachyfylaxe.

TRPV1 receptory jsou funkčně zapojeny do nociceptivních drah již od narození, ale velikost odpovědi na aplikaci jejich agonisty, kterou jsou schopny vyvolat v podobě mEPSC v postsynaptických neuronech, se u potkanů výrazně zvyšuje kolem desátého postnatálního dne (Baccei, Bardoni a Fitzgerald, 2003). Také distribuce TRPV1 mezi různými populacemi neuronů se v průběhu ontogenetického vývoje mění, až by se dle pozorování Cavanaugh a kol. (2011) měla kolem 20. dne ustálit na expresi téměř výhradně v peptidergických DRG neuronech, které specificky zajišťují nociceptivní signalizaci. Zároveň s tím se u mláďat také snižuje celková míra exprese TRPV1, která

se stabilizuje mezi 15. a 22. postnatálním dnem na úrovni exprese u dospělého jedince. Ta odpovídá dle pozorování této skupiny výzkumníků téměř polovičnímu množství původně pozorovaných neuronů (Cavanaugh, Chesler, Bráz, *et al.*, 2011). Jestliže by zvýšení frekvence spontánních mEPSC po aplikaci kapsaicinu během vývoje zvířete, což by svědčilo o zvýšení exprese TRPV1 receptorů, bylo u potkanů větší než u myší, mohlo by vést k větší odolnosti proti působení paclitaxelu na přirozenou tachyfylixi. Trvalé zvýšení exprese TRPV1 by také mohlo znamenat dosažení vyšší míry desenzitizace, kterou by paclitaxel nedovedl úplně zvrátit. To by vedlo k nižší 2. odpovědi při opakovaném podání kapsaicinu u potkana ve srovnání s myší, což ukazují i aktuální výsledky mé práce na potkanech.

5.3 Vliv akutní aplikace minocyklinu na změnu frekvence mEPSC při opakované aplikaci kapsaicinu

Vliv minocyklinu na nervovou soustavu se projevuje více způsoby (Zhang *et al.*, 2012; Möller *et al.*, 2016), nicméně často bývá využívána především jeho schopnost blokování aktivace mikroglií (Mei *et al.*, 2011; Yoon, Patel a Dougherty, 2012; Stokes *et al.*, 2017). Nejprve bylo potřeba v základním experimentálním schématu ověřit, zda samotná aplikace minocyklinu u použitého modelu neovlivňuje sledovaný proces tachyfylyxi. Druhá odpověď na aplikaci kapsaicinu sice v absolutní frekvenci nevycházela signifikantně odlišná od první odpovědi, ale to mohlo být způsobeno slabší silou testu kvůli menšímu počtu buněk získaných do této skupiny. Po normalizaci první odpovědi již byl stejně jako v ostatních skupinách významný rozdíl mezi oběma odpověďmi pozorován. Analýza získaných dat jinak nevedla k pozorování žádných signifikantních změn oproti kontrolní skupině. Akutně aplikovaný minocyklin výrazně neovlivnil vlastnosti mEPSC při opakované odpovědi na aplikaci kapsaicinu z hlediska frekvence ani amplitudy. González a kolektiv pozorovali při akutní aplikaci minocyklinu snižování četnosti měřených akčních potenciálů (González *et al.*, 2007), nicméně pouze na kulturách hipokampálních neuronů. V mém protokolu použitém ke snímání mEPSC byl do extracelulárního roztoku (sECS) přidán tetrodotoxin, blokátor napěťových Na⁺ kanálů zamezující vzniku AP, tudíž se tento vliv minocyklinu nemohl v mých pokusech projevit.

5.4 Vliv minocyklinu na působení paclitaxelu na tachyfyaxi odpovědi při opakované aplikaci kapsaicinu

Východiskem experimentální otázky, zda aplikace minocyklinu ovlivní působení paclitaxelu na tachyfyaxi odpovědi na druhou aplikaci kapsaicinu, byla představa mechanismu působení paclitaxelu. Jak bylo zjištěno, toto chemoterapeutikum ovlivňuje senzitivitu TRPV1 receptorů na DRG neuronech a způsobuje jejich častější aktivaci, která následně může vést ke tvorbě stavů zvýšené citlivosti, jako je termální hyperalgie a alodynie (Hara *et al.*, 2013). Tyto nefyziologické bolestivé projevy vznikají vazbou molekul paclitaxelu na TLR4 receptorové komplexy (Yan *et al.*, 2015), které se aktivují a přes MyD88 adaptorový protein spouštějí navazující intracelulární kaskády popsané v úvodní části. Pro převod jejich aktivity na nociceptivní signalizaci vedoucí k bolestivým projevům je důležitá aktivita MAPK, ERK1/2 a řady dalších kináz, které jsou součástí těchto kaskád (Ji *et al.*, 1999). Ty také mohou kromě iniciace neuroinflamačních procesů a exprese prozánětlivých faktorů v mikrogliích prostřednictvím fosforylace TRPV1 receptorů způsobit jejich senzitivizaci. V případě koexprese TLR4 a TRPV1 ve stejných buňkách by mohlo ke zprostředkování tohoto převodu dojít přímo prostřednictvím výše uvedených aktivovaných kináz (Li, Zhang, *et al.*, 2015).

Bylo ověřeno, že ke koexpresi TRPV1 a TLR4 receptorů dochází. Prokázána byla na DRG neuronech potkanů a myši i v potkaních akutních míšních řezech (Li, Adamek, *et al.*, 2015). Funkční propojení těchto receptorů při aktivaci TLR4 vedlo ke vzniku hyperalgie. V této studii stačila několikadenní aplikace paclitaxelu, aby došlo ke vzniku a přetrvávání neuropatie (Li, Adamek, *et al.*, 2015).

Jelikož exprese TLR4 receptorů probíhá na neuronech i na mikrogliích (Bsibsi *et al.*, 2002; Diogenes *et al.*, 2011), tak by v určitých stavech k modulaci aktivity TRPV1 receptorů paclitaxelem mohlo docházet i nepřímo, prostřednictvím aktivní účasti mikroglií. Jejich TLR4 receptory spuštěním svých intracelulárních drah a následnou MAP kinázovou aktivitou (MAPK, ERK1/2 kinázy) způsobují iniciaci neuroinflamace, která se projevuje zvýšenou expresí prozánětlivých genů, a dochází k výlevu proinflamačních mediátorů jako IL-1 β , CCL2 či TNF α . Z nich především cytokin TNF α má vliv na zvýšenou aktivitu nociceptivních neuronů, jelikož jeho zvýšené množství senzitivizuje TRPV1 receptory a vede ke zvýšené frekvenci mEPSC (Spicarova a Palecek,

2010; Li, Zhang, *et al.*, 2015). Cytokin CCL2 může prostřednictvím aktivace neuronálních CCR2 receptorů také způsobit senzitivizaci presynaptických TRPV1 receptorů. Obě možnosti potom vedou ke zvýšené aktivitě nociceptivního synaptického přenosu (Gao *et al.*, 2009; Spicarova *et al.*, 2014).

V literatuře je diskutována možnost exprese TLR4 a také potenciální odlišná role těchto receptorů na astrocytech (McCarthy *et al.*, 2017), ale tato otázka stále není vyřešena. Na místní úrovni je tedy prokázána exprese a úloha TLR4 v mikroglíích (Jurga *et al.*, 2016). Vznik neuroinflamace, projevující se aktivací mikroglíí, které uvolňují proinflamační cytokiny, byl pozorován především u modelů neuropatické bolesti navozených přímým mechanickým poraněním nervové soustavy, například podvazem vybraného míšního nervu (model **SNL**); (Guasti *et al.*, 2009). Na modelu bolestivého stavu vytvořeného aplikací paclitaxelu byla v přímé souvislosti s experimentální aplikací minocyklinu potlačena většina paclitaxelem vyvolaných projevů. V tomto pozorování k nim nepatřila tvorba prozánětlivých mediátorů, jelikož jejich hladina zde nebyla zvýšená (Zhang *et al.*, 2012). Po aplikaci paclitaxelu byla pozorována snížená míra zpětného vychytávání glutamátu ze synaptické štěrbiny prostřednictvím GLT1 a GLAST transportérů na astrocytech. Tyto transportéry, které byly působením paclitaxelu částečně internalizované, se při aplikaci minocyklinu znovu dostaly na povrch a potlačily tak zvětšenou mEPSC odpověď provázející aplikaci paclitaxelu (Nie, Zhang a Weng, 2010; Zhang *et al.*, 2012).

Pro rozlišení role mikroglíálních a neuronálních TLR4 receptorů byl v mé práci použit minocyklin, běžně využívaný k zablokování funkce mikroglíí (Guasti *et al.*, 2009; Yoon, Patel a Dougherty, 2012). Akutně aplikovaný minocyklin ani ve vysoké koncentraci nepotlačil vliv paclitaxelu na tachyfylaxi kapsaicinu, jelikož frekvence mEPSC při opakované odpovědi na kapsaicin při aplikaci samotného 50nM paclitaxelu i při jeho aplikaci současně se 100μM minocyklinem dosahovaly v průměru mírně nad 60 % první aplikace kapsaicinu.

Předchozí studie sledující dlouhodobější působení minocyklinu a paclitaxelu již vedla k pozorování úspěšného působení minocyklinu na potlačení projevů (termální allodynie i mechanické a termální hyperalgezie) dlouhodobé aplikace paclitaxelu (Cata, Weng a Dougherty, 2008). Otázkou ovšem zůstává, jakými způsoby může minocyklin působení tohoto chemoterapeutika ovlivnit. Bylo zjištěno, že paclitaxel ke svým účinkům na buňky zapojené v přenosu nociceptivní informace potřebuje funkční expresi TLR4 receptorů. Bolestivé projevy poté vznikají následkem přímému působení paclitaxelu díky působení na tyto receptory (Woo *et al.*, 2008). Při užívání paclitaxelu pacienti bylo změřeno jeho hromadění v rámci nervové soustavy především v DRG, která nejsou účinně oddělena od zbytku těla hematoencefalickou bariérou jako většina CNS. I přes svou nízkou schopnost přechodu skrz tuto bariéru dostahuje jeho nízká, nanomolární koncentrace na ovlivnění centrálních zakončení DRG neuronů a superficiálních míšních buněk (Zhang a Dougherty, 2014). Jejich TLR4 receptory potom reagují na paclitaxel podobně jako na výskyt bakteriálních fragmentů v podobě LPS (Yan *et al.*, 2015).

Jelikož exprese těchto receptorů byla pozorována nejen na neuronálních, ale též na gliových buňkách (Buchanan *et al.*, 2010; Diogenes *et al.*, 2011), může být celkový vliv paclitaxelu vytvářen prostřednictvím iniciace několika paralelních drah, které na sobě mohou být jen částečně závislé, nebo se mohou projevovat odděleně v různých (ne)fyziologických podmínkách.

Jedním z pozorovaných účinků paclitaxelu byl jeho vliv na senzitivizaci TRPV1 receptorů skrz intracelulární fosforylační procesy spuštěné aktivací TLR4 receptorů, který se experimentálně projevoval zvýšením frekvence mEPSC odpovědi na zvýšený výlev presynaptických mediátorů z DRG neuronů. TLR4 receptory zde byly aktivovány přímo na centrálních zakončeních DRG neuronů. Následná aktivace navazujících intracelulárních kaskád zahrnujících fosforylaci MAP kináz mohla ve zvýšené míře vést též k aktivaci PI3K, která svou fosforylační aktivitou senzitivizuje TRPV1 receptory (Li, Adamek, *et al.*, 2015; Liu, Lv a Ren, 2018; Adamek, Heles a Palecek, 2019).

V této práci bylo pozorováno, že devadesátiminutová inkubace řezů v roztoku 100 μ M minocyklinu na rozdíl od akutního působení minocyklinu na tachyfylixi odpovědi na aplikaci kapsaicinu vedla k potlačení senzitivizačního vlivu paclitaxelu na aktivitu nociceptivních neuronů I. a II. míšní laminy. Při této modulaci pravděpodobně

neslo významný podíl potlačení procesů vedoucích k produkci mikrogliálních cytokinů, které by mohly posilovat senzitivizaci TRPV1 receptorů, čímž by bránily jejich přirozené desenzitivizaci (Jurga *et al.*, 2018). Druhá odpověď na kapsaicin se po inkubaci v minocyklinu snížila ke čtyřiačtyřiceti procentům první odpovědi (viz obrázek 13). Tato pozorovaná frekvence mEPSC v odpovědi na opakovanou aplikaci kapsaicinu nebyla odlišná od frekvence mEPSC způsobené tachyfylaxí kapsaicinu při jeho opakované aplikaci v kontrolní skupině.

Blokáda aktivace mikroglií tedy potlačila účinek paclitaxelu na kapsaicinem vyvolané odpovědi. Tyto pokusy tak ukázaly, že aktivace gliových buněk se může významně podílet i na modulaci nociceptivního synaptického přenosu a bolestivých stavech při paclitaxelem navozené neuropatii (Guasti *et al.*, 2009; Yoon, Patel a Dougherty, 2012; Zajackowska *et al.*, 2018).

6 Závěr

Je známo, že po aplikaci kapsaicinu dochází k tachyfylaxi. Moje pokusy ukázaly, že inkubace míšních řezů v minocyklinu zabránila působení paclitaxelu na tachyfylaxi odpovědi na kapsaicin opakovaně aplikovaný na neurony *in vitro*. Přitom akutní aplikace minocyklinu v této práci nevedla k žádným významným změnám v působení paclitaxelu.

Výsledky této práce naznačují, že se buňky mikroglie svou aktivitou alespoň částečně podílejí na působení paclitaxelu při potlačování tachyfylaxe odpovědi na opakované podání kapsaicinu. I když jednoznačně neurčují, přes kterou z populací TLR4 receptorů (na gliích či neuronech) tato látka působí, v diskuzi jsou navrženy procesy, které by nízká koncentrace paclitaxelu v míše mohla ovlivňovat při svém působení vedoucím u pacientů k bolestivým projevům.

Pro hlubší poznání mechanismů účinku paclitaxelu na míšní úrovni při vznikajících bolestivých stavech bude potřeba ještě doplnit další elektrofyziologická měření a pravděpodobně i rozšířit používaný metodický přístup.

7 Použitá literatura

Přehledové články jsou odlišeny označením [Review] za názvem konkrétní práce.

1. Adamek, P., Heles, M. a Palecek, J. (2019) „Mechanical allodynia and enhanced responses to capsaicin are mediated by PI3K in a paclitaxel model of peripheral neuropathy", *Neuropharmacology*. Elsevier, 146 (July 2018), s. 163–174. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.11.027.
2. Alexopoulou, L. *et al.* (2001) „Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3", *Nature*, 413 (6857), s. 732–8. doi: 10.1038/35099560.
3. Alexopoulou, L. *et al.* (2002) „Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice", *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm732.
4. Anthoney, N., Foldi, I. a Hidalgo, A. (2018) „Toll and Toll-like receptor signalling in development", *Development*, 145(9). doi: 10.1242/dev.156018.
5. Baccei, M. L., Bardoni, R. a Fitzgerald, M. (2003) „Development of nociceptive synaptic inputs to the neonatal rat dorsal horn: Glutamate release by capsaicin and menthol", *Journal of Physiology*, 549(1), s. 231–242. doi: 10.1113/jphysiol.2003.040451.
6. Bagheri, V. *et al.* (2014) „Can Toll-Like Receptor (TLR) 2 be considered as a new target for immunotherapy against hepatitis B infection?", *Human Immunology*. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 75(6), s. 549–554. doi: 10.1016/j.humimm.2014.02.018.
7. Barrell, K. a Smith, A. G. (2019) „Peripheral Neuropathy", *Medical Clinics of North America*. Elsevier Inc, 103(2), s. 383–397. doi: 10.1016/j.mcna.2018.10.006.
8. Basbaum, A. I. *et al.* (2009) „Cellular and Molecular Mechanisms of Pain [Review]", *Cell*, 139(2), s. 267–284. doi: 10.1016/j.cell.2009.09.028.
9. Bettoni, I. *et al.* (2008) „Glial TLR4 receptor as new target to treat neuropathic pain: Efficacy of a new receptor antagonist in a model of peripheral nerve injury in mice", *Glia*, 56(12), s. 1312–1319. doi: 10.1002/glia.20699.
10. Beyak, M. J. a Vanner, S. (2005) „Inflammation-induced hyperexcitability of nociceptive gastrointestinal DRG neurones: the role of voltage-gated ion channels", *Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, 17(2), s. 175–186.
11. Bhawe, G. *et al.* (2003) „Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), s. 12480–12485. doi: 10.1073/pnas.2032100100.
12. Biswas, A. (2015) *Recent advancements in pain sciences, 13th state IAP conference, Kolkata*. Kolkata.
13. Boeglin, E. *et al.* (2011) „Toll-Like receptor agonists synergize with CD40L to induce either proliferation or plasma cell differentiation of mouse B cells", *PLoS ONE*, 6(10). doi: 10.1371/journal.pone.0025542.

14. Boyette-Davis, J. A. *et al.* (2011) „Intraepidermal nerve fiber loss corresponds to the development of taxol-induced hyperalgesia and can be prevented by treatment with minocycline.", *Pain*, 152(2), s. 308–13. doi: 10.1016/j.pain.2010.10.030.
15. Boyette-Davis, J. A., Walters, E. T. a Dougherty, P. M. (2015) „Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy", *Pain management*, 5(4), s. 285–96. doi: 10.2217/pmt.15.19.
16. Bsibsi, M. *et al.* (2002) „Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system.", *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 61(11), s. 1013–1021. doi: 10.1093/jnen/61.11.1013.
17. Buchanan, M. M. *et al.* (2010) „Toll-like receptor 4 in CNS pathologies [Review]", *Journal of neurochemistry*, 114(1), s. 13–27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06736.x.
18. Cao, L., Tanga, F. Y. a Deleo, J. A. (2009) „The contributing role of CD14 in toll-like receptor 4 dependent neuropathic pain.", *Neuroscience*, 158(2), s. 896–903. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.10.004.
19. Cata, J. P., Weng, H. R. a Dougherty, P. M. (2008) „The effects of thalidomide and minocycline on taxol-induced hyperalgesia in rats", *Brain Research*, 1229, s. 100–110. doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.001.
20. Caterina, M. J. *et al.* (1997) „The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway", *Nature*, 389(6653), s. 816–824. doi: 10.1038/39807.
21. Caterina, M. J. (2000) „Impaired Nociception and Pain Sensation in Mice Lacking the Capsaicin Receptor", *Science*, 288 (5464), s. 306–313. doi: 10.1126/science.288.5464.306.
22. Caterina, M. J. a Julius, D. (2001) „The Vanilloid Receptor: A Molecular Gateway to the Pain Pathway [Review]", *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), s. 487–517. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.487.
23. Cavanaugh, D. J. *et al.* (2009) „Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(22), s. 9075–9080. doi: 10.1073/pnas.0901507106.
24. Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Bráz, J. M., *et al.* (2011) „Restriction of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 to the Peptidergic Subset of Primary Afferent Neurons Follows Its Developmental Downregulation in Nonpeptidergic Neurons", *Journal of Neuroscience*, 31(28), s. 10119–10127. doi: 10.1523/jneurosci.1299-11.2011.
25. Cavanaugh, D. J., Chesler, A. T., Jackson, A. C., *et al.* (2011) „Trpv1 Reporter Mice Reveal Highly Restricted Brain Distribution and Functional Expression in Arteriolar Smooth Muscle Cells", *Journal of Neuroscience*, 31(13), s. 5067–5077. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011.
26. Chan, C. L. H. *et al.* (2003) „Sensory fibres expressing capsaicin receptor TRPV1 in patients with rectal hypersensitivity and faecal urgency", *Lancet*, 361(9355), s. 385–391. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12392-6.
27. Clapham, D. E. (2003) „TRP channels as cellular sensors. [Review]", *Nature*, 426(6966), s. 517–24. doi: 10.1038/nature02196.

28. Clark, A. K. *et al.* (2015) „Selective Activation of Microglia Facilitates Synaptic Strength", *Journal of Neuroscience*, 35(11), s. 4552–4570. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2061-14.2015.
29. Colloca, L. *et al.* (2017) „Neuropathic pain [Review]", *Nature Reviews Disease Primers*, 3, s. 17002. doi: 10.1038/nrdp.2017.2.
30. Davies, M. *et al.* (2006) „The Prevalence, Severity, and Impact of Painful Diabetic Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetes", *Diabetes Care*, 29(7), s. 1518–1522. doi: 10.2337/dc05-2228.
31. Diogenes, A. *et al.* (2011) „LPS Sensitizes TRPV1 via Activation of TLR4 in Trigeminal Sensory Neurons", *Journal of Dental Research*, 90(6), s. 759–764. doi: 10.1177/0022034511400225.
32. Dubin, A. E. a Patapoutian, A. (2010) „Nociceptors: The sensors of the pain pathway [Review]", *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), s. 3760–3772. doi: 10.1172/JCI42843.
33. Dworkin, R. H. *et al.* (2010) „Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update", *Mayo Clinic Proceedings*, 85(3), s. S3–S14. doi: 10.4065/mcp.2009.0649.
34. Fenwick, A. J. *et al.* (2017) „Direct Anandamide Activation of TRPV1 Produces Divergent Calcium and Current Responses", *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(June), s. 1–11. doi: 10.3389/fnmol.2017.00200.
35. Finnerup, N. B. *et al.* (2015) „Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. [Review]", *The Lancet. Neurology*, 14(2), s. 162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
36. François, A. *et al.* (2017) „A Brainstem-Spinal Cord Inhibitory Circuit for Mechanical Pain Modulation by GABA and Enkephalins", *Neuron*, 93(4), s. 822–839.e6. doi: 10.1016/j.neuron.2017.01.008.
37. Gao, Y.-J. *et al.* (2009) „JNK-Induced MCP-1 Production in Spinal Cord Astrocytes Contributes to Central Sensitization and Neuropathic Pain", *Journal of Neuroscience*, 29(13), s. 4096–4108. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3623-08.2009.
38. Gautam, M. *et al.* (2016) „Role of neurokinin type 1 receptor in nociception at the periphery and the spinal level in the rat", *Spinal Cord*. Nature Publishing Group, 54(3), s. 172–182. doi: 10.1038/sc.2015.206.
39. Godfroy, J. I. *et al.* (2012) „Isolated Toll-like Receptor Transmembrane Domains Are Capable of Oligomerization", *PLoS ONE*. Editoval N. Gay. San Francisco, USA: Public Library of Science, 7(11), s. e48875. doi: 10.1371/journal.pone.0048875.
40. González-Ramírez, R. *et al.* (2017) „TRP Channels and Pain [Review]", in Rosenbaum Emir, T. L. (ed.) *Neurobiology of TRP Channels*. 2. Boca Raton : CRC Press, 2017.: CRC Press. doi: 10.4324/9781315152837-8.
41. González, J. C. *et al.* (2007) „Neuroprotectant minocycline depresses glutamatergic neurotransmission and Ca²⁺ signalling in hippocampal neurons", *European Journal of Neuroscience*, 26(9), s. 2481–2495. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05873.x.

42. Gorina, R. *et al.* (2011) „Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways", *Glia*, 59(2), s. 242–255. doi: 10.1002/glia.21094.
43. Gu, X. L. a Yu, L. C. (2007) „The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal horn neuron of rat: A morphological and electrophysiological study", *Neuroscience Letters*, 414(3), s. 237–241. doi: 10.1016/j.neulet.2006.12.056.
44. Guasti, L. *et al.* (2009) „Minocycline treatment inhibits microglial activation and alters spinal levels of endocannabinoids in a rat model of neuropathic pain", *Molecular Pain*, 5(35). doi: 10.1186/1744-8069-5-35.
45. Hanlon, L. A., Huh, J. W. a Raghupathi, R. (2016) „Minocycline transiently reduces microglia/macrophage activation but exacerbates cognitive deficits following repetitive traumatic brain injury in the neonatal rat", *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 75(3), s. 214–226. doi: 10.1093/jnen/nlv021.
46. Hara, T. *et al.* (2013) „Effect of paclitaxel on transient receptor potential vanilloid 1 in rat dorsal root ganglion", *Pain. International Association for the Study of Pain*, 154(6), s. 882–889. doi: 10.1016/j.pain.2013.02.023.
47. Hayashi, F. *et al.* (2001) „The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5", *Nature*, 410(6832), s. 1099–103. doi: 10.1038/35074106.
48. Heinricher, M. M. *et al.* (2009) „Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity [Review]", *Brain Research Reviews*, 60(1), s. 214–225. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.009.
49. Hiura, A. (2009) „Is thermal nociception only sensed by the capsaicin receptor, TRPV1? [Review]", *Anatomical Science International*, 84(3), s. 122–128. doi: 10.1007/s12565-009-0048-8.
50. Hua, F. *et al.* (2015) „TAK-242, an Antagonist for Toll-like Receptor 4, Protects against Acute Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Mice", *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. Nature Publishing Group*, 35(4), s. 536–542. doi: 10.1038/jcbfm.2014.240.
51. Hung, C. Y. a Tan, C. H. (2018) „TRP channels in nociception and pathological pain [Review]", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1099, s. 13–27. doi: 10.1007/978-981-13-1756-9_2.
52. Hur, J. *et al.* (2014) „Integrated Systems Pharmacology Analysis of Clinical Drug-Induced Peripheral Neuropathy", *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.*, 3(5), s. e114. doi: 10.1038/psp.2014.11.
53. Hurtado-Zavala, J. I. *et al.* (2017) „TRPV1 regulates excitatory innervation of OLM neurons in the hippocampus", *Nature Communications. Nature Publishing Group*, 8(May). doi: 10.1038/ncomms15878.
54. Hutchinson, M. R. *et al.* (2008) „Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4)", *European Journal of Neuroscience*, 28(1), s. 20–29. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06321.x.
55. IASP (2018) *IASP: taxonomy, International Association for the Study of Pain*. Dostupné z: <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy> (Viděno: 25. únor 2019).

56. Institute of Medicine (US) Committee on Advancing Pain Research, Care, and Education (2011) *Relieving Pain in America*. Washington (DC): National Academies Press (US).
57. Jardín, I. *et al.* (2017) „TRPs in pain sensation [Review]“, *Frontiers in Physiology*, 8, s. 1-10. doi: 10.3389/fphys.2017.00392.
58. Ji, R.-R. *et al.* (1999) „Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity“, *Nature Neuroscience*, 2(12), s. 1114–1119. doi: 10.1038/16040.
59. Ji, R.-R., Berta, T. a Nedergaard, M. (2013) „Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?“, *Pain*, 154(0 1), s. S10–S28. doi: 10.1016/j.pain.2013.06.022.
60. Ji, R. R., Xu, Z.-Z. a Gao, Y.-J. (2014) „Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain [Review]“, *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 13(7), s. 533–548. doi: 10.1038/nrd4334.
61. Jin, M. S. a Lee, J.-O. (2008a) „Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes.“, *Immunity*, 29(2), s. 182–91. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.007.
62. Jin, M. S. a Lee, J.-O. (2008b) „Structures of the Toll-like Receptor Family and Its Ligand Complexes“, *Immunity*, 29(2), s. 182–191. doi: 10.1016/j.immuni.2008.07.007.
63. Johnson, D. C. *et al.* (2011) „Genetic factors underlying the risk of thalidomide-related neuropathy in patients with multiple myeloma.“, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), s. 797–804. doi: 10.1200/JCO.2010.28.0792.
64. Jordt, S.-E. a Julius, D. (2002) „Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to “Hot” Chili Peppers“, *Cell*, 108(3), s. 421–430. doi: 10.1016/S0092-8674(02)00637-2.
65. Jou, I. *et al.* (2006) „Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia“, *American Journal of Pathology*, 168(5), s. 1619–1630. doi: 10.2353/ajpath.2006.050924.
66. Jurga, A. M. *et al.* (2016) „Blockade of Toll-Like Receptors (TLR2, TLR4) Attenuates Pain and Potentiates Buprenorphine Analgesia in a Rat Neuropathic Pain Model“, *Neural Plasticity*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, s. 1–12. doi: 10.1155/2016/5238730.
67. Jurga, A. M. *et al.* (2018) „Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* (TLR4 antagonist) attenuates hypersensitivity and modulates nociceptive factors“, *Pharmaceutical biology*. Informa Healthcare USA, Inc, 56(1), s. 275–286. doi: 10.1080/13880209.2018.1457061.
68. Kagan, J. C. *et al.* (2008) „TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β “, *Nature Immunology*, 9(4), s. 361–368. doi: 10.1038/ni1569.
69. Kannampalli, P. *et al.* (2014) „Analgesic effect of minocycline in rat model of inflammation-induced visceral pain“, *European Journal of Pharmacology*, 727(1), s. 87–98. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.01.026.
70. Kim, H. M. *et al.* (2007) „Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran“, *Cell*, 130(5), s. 906–917. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.002.

71. Lawson, S. N. (2002) „Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Adelta- or Aalpha/beta-fibres", *Experimental physiology*, 87(2), s. 239–44. doi: EPH_2350 [pii].
72. Lee, C. J. *et al.* (2001) „Kainate Receptors Expressed by a Subpopulation of Developing Nociceptors Rapidly Switch from High to Low Ca²⁺ Permeability", *The Journal of Neuroscience*, 21(13), s. 4572–4581. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-13-04572.2001.
73. Lee, J. Y. *et al.* (2001) „Saturated Fatty Acids, but Not Unsaturated Fatty Acids, Induce the Expression of Cyclooxygenase-2 Mediated through Toll-like Receptor 4", *Journal of Biological Chemistry*, 276(20), s. 16683–16689. doi: 10.1074/jbc.M011695200.
74. Li, J. *et al.* (2016) „Therapeutic Developments Targeting Toll-like Receptor-4-Mediated Neuroinflammation [Review]", *ChemMedChem*, 11(2), s. 154–165. doi: 10.1002/cmdc.201500188.
75. Li, Y. *et al.* (2014) „Toll-like receptor 4 signaling contributes to Paclitaxel-induced peripheral neuropathy.", *The journal of pain: official journal of the American Pain Society*. Elsevier Ltd, 15(7), s. 712–25. doi: 10.1016/j.jpain.2014.04.001.
76. Li, Y., Zhang, H., *et al.* (2015) „MAPK signaling downstream to TLR4 contributes to paclitaxel-induced peripheral neuropathy", *Brain, Behavior, and Immunity*. Elsevier Inc., 49, s. 255–266. doi: 10.1016/j.bbi.2015.06.003.
77. Li, Y., Adamek, P., *et al.* (2015) „The Cancer Chemotherapeutic Paclitaxel Increases Human and Rodent Sensory Neuron Responses to TRPV1 by Activation of TLR4", *Journal of Neuroscience*, 35(39), s. 13487–13500. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1956-15.2015.
78. Liu, B. *et al.* (2000) „Reduction by naloxone of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse cortical neuron–glia co-cultures", *Neuroscience*, 97(4), s. 749–756. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00057-9.
79. Liu, T., Gao, Y.-J. a Ji, R.-R. (2012) „Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch [Review]", *Neuroscience Bulletin*, 28(2), s. 131–144. doi: 10.1007/s12264-012-1219-5.
80. Liu, W., Lv, Y. a Ren, F. (2018) „PI3K/Akt Pathway is Required for Spinal Central Sensitization in Neuropathic Pain.", *Cellular and molecular neurobiology*. United States, 38(3), s. 747–755. doi: 10.1007/s10571-017-0541-x.
81. Lohmann, K. (2003) „Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* is an agonist in equine cells." doi: 10.1179/096805103125001315.
82. McCarthy, G. M. *et al.* (2017) „CNS cell-type localization and LPS response of TLR signaling pathways", *F1000Research*, 6(0), s. 1144. doi: 10.12688/f1000research.12036.1.
83. McHugh, J. M. a McHugh, W. B. (2000) „Pain: neuroanatomy, chemical mediators, and clinical implications [Review]", *AACN clinical issues*, 11(2), s. 168–78.
84. McKenna, O. E. *et al.* (2016) „Oxidative stress in the development, maintenance and resolution of paclitaxel-induced painful neuropathy", *Neuroscience*. The Authors, 333, s. 13–26. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.06.050.

85. Mei, X. P. *et al.* (2011) „Post-injury administration of minocycline: An effective treatment for nerve-injury induced neuropathic pain", *Neuroscience Research*. Elsevier Ireland Ltd and Japan Neuroscience Society, 70(3), s. 305–312. doi: 10.1016/j.neures.2011.03.012.
86. Messegue, A., Planells-cases, R. a Ferrer-montiel, A. (2006) „Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor", *Current neuropharmacology*, 4(1), s. 1–15.
87. Mika, J. *et al.* (2008) „Interleukin-1alpha has antiallodynic and antihyperalgesic activities in a rat neuropathic pain model", *Pain*, 138(3), s. 587–597. doi: 10.1016/j.pain.2008.02.015.
88. Mika, J. *et al.* (2013) „Importance of glial activation in neuropathic pain", *European journal of pharmacology*. Elsevier, 716(1–3), s. 106–19. doi: 10.1016/j.ejphar.2013.01.072.
89. Millan, M. J. (1997) „The Role of Descending Noradrenergic and Serotonergic Pathways in the Modulation of Nociception: Focus on Receptor Multiplicity", in Dickenson, A. a Besson, J.-M. (ed.) *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, s. 385–446. doi: 10.1007/978-3-642-60777-6_15.
90. Mitterreiter, J. G. *et al.* (2017) „Satellite glial cells in human trigeminal ganglia have a broad expression of functional Toll-like receptors", *European Journal of Immunology*, 47(7), s. 1181–1187. doi: 10.1002/eji.201746989.
91. Möller, T. *et al.* (2016) „Critical data-based re-evaluation of minocycline as a putative specific microglia inhibitor", *Glia*, 64(10), s. 1788–1794. doi: 10.1002/glia.23007.
92. Moore, C. *et al.* (2018) „Regulation of Pain and Itch by TRP Channels [Review]", *Neuroscience Bulletin*. Springer Singapore, 34(1), s. 120–142. doi: 10.1007/s12264-017-0200-8.
93. Naseri, K. *et al.* (2013) „Role of Microglia and Astrocyte in Central Pain Syndrome Following Electrolytic Lesion at the Spinothalamic Tract in Rats", *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(3), s. 470–479. doi: 10.1007/s12031-012-9840-3.
94. Neumann, S. *et al.* (1996) „Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons", *Nature*, 384(6607), s. 360–364. doi: 10.1038/384360a0.
95. Nie, H., Zhang, H. a Weng, H.-R. (2010) „Minocycline prevents impaired glial glutamate uptake in the spinal sensory synapses of neuropathic rats", *Neuroscience*, 170(3), s. 901–912. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.07.049.
96. O'Neill, L. A. J., Golenbock, D. a Bowie, A. G. (2013) „The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity [Review]", *Nature Reviews Immunology*, 13(6), s. 453–460. doi: 10.1038/nri3446.
97. Ogata, H. *et al.* (2000) „The Toll-like Receptor Protein Rp105 Regulates Lipopolysaccharide Signaling in B Cells", *The Journal of Experimental Medicine*, 192(1), s. 23–30. doi: 10.1084/jem.192.1.23.
98. Olson, J. K. a Miller, S. D. (2004) „Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs", *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173(6), s. 3916–24. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.3916.

99. Oosting, M. *et al.* (2014) „Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42), s. E4478–E4484. doi: 10.1073/pnas.1410293111.
100. Ossipov, M. H., Morimura, K. a Porreca, F. (2014) „Descending pain modulation and chronification of pain", *Current opinion in supportive and palliative care*, 8(2), s. 143–51. doi: 10.1097/SPC.0000000000000055.
101. Palecek, J., Paleckova, V. a Willis, W. D. (2002) „The roles of pathways in the spinal cord lateral and dorsal funiculi in signaling nociceptive somatic and visceral stimuli in rats", *Pain*, 96(3), s. 297–307. doi: 10.1016/S0304-3959(01)00459-6.
102. Patapoutian, A. *et al.* (2003) „ThermoTRP channels and beyond: mechanisms of temperature sensation [Review]", *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 4(7), s. 529–539. doi: 10.1038/nrn1141.
103. Pedersen, S. F., Owsianik, G. a Nilius, B. (2005) „TRP channels: An overview", *Cell Calcium*, 38(3–4 SPEC. ISS.), s. 233–252. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.028.
104. Pertovaara, A. (2006) „Noradrenergic pain modulation [Review]", *Progress in Neurobiology*, 80(2), s. 53–83. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.08.001.
105. Poltorak, A. (1998) „Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene", *Science*, 282(5396), s. 2085–2088. doi: 10.1126/science.282.5396.2085.
106. Prato, V. *et al.* (2017) „Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive “Silent” Nociceptors", *Cell Reports*. ElsevierCompany., 21(11), s. 3102–3115. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.066.
107. Resman, N. *et al.* (2014) *Tetraacylated Lipid A and Paclitaxel-Selective Activation of TLR4/MD-2 Conferred through Hydrophobic Interactions*, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. doi: 10.4049/jimmunol.1302119.
108. Rokyta, R. (2006) *Neuroanatomie Bolesti, Psychiatrie*.
109. Ruscheweyh, R. a Sandkühler, J. (2002) „Role of kainate receptors in nociception [Review]", *Brain Research Reviews*, 40(1–3), s. 215–222. doi: 10.1016/S0165-0173(02)00203-5.
110. Sabroe, I. *et al.* (2002) „Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses.", *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 168(9), s. 4701–4710. doi: 10.4049/jimmunol.168.9.4701.
111. Salem, A. *et al.* (2017) „Altered Expression of Toll-like Receptors in Human Oral Epithelium in Oral Lichenoid Reactions.", *The American Journal of dermatopathology*, 39(11), s. 811–818. doi: 10.1097/DAD.0000000000000807.
112. Sasaki, N. *et al.* (2009) „Toll-like receptors of the ascidian ciona intestinalis. Prototypes with hybrid functionalities of vertebrate toll-like receptors", *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), s. 27336–27343. doi: 10.1074/jbc.M109.032433.
113. Schmidt, R. *et al.* (1995) „Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin", *The Journal of Neuroscience*, 15(1), s. 333–341. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00333.1995.

114. Seretny, M. *et al.* (2014) „Incidence , prevalence , and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis [Review]", *Pain. International Association for the Study of Pain*, 155(12), s. 2461–2470. doi: 10.1016/j.pain.2014.09.020.
115. Sikand, P. a Premkumar, L. S. (2007) „Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse", *Journal of Physiology*, 581(2), s. 631–647. doi: 10.1113/jphysiol.2006.118620.
116. Smith, E. S. J. a Lewin, G. R. (2009) „Nociceptors: a phylogenetic view.", *Journal of comparative physiology. A, Neuroethology, sensory, neural, and behavioral physiology*, 195(12), s. 1089–1106. doi: 10.1007/s00359-009-0482-z.
117. Spicarova, D. *et al.* (2014) „TRPV1 receptor inhibition decreases CCL2-induced hyperalgesia", *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 81, s. 75–84. doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.01.041.
118. Spicarova, D. a Palecek, J. (2010) „Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine.", *Journal of neuroinflammation*, 7(1), s. 49. doi: 10.1186/1742-2094-7-49.
119. Starobova, H. a Vetter, I. (2017) „Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy", *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(May), s. 1–21. doi: 10.3389/fnmol.2017.00174.
120. Stevens, C. F. a Williams, J. H. (2000) „Kiss and run' exocytosis at hippocampal synapses", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(23), s. 12828–12833. doi: 10.1111/cei.12132.
121. Stokes, J. A. *et al.* (2017) „Minocycline blocks glial cell activation and ventilatory acclimatization to hypoxia", *Journal of Neurophysiology*, 117(4), s. 1625–1635. doi: 10.1152/jn.00525.2016.
122. Story, G. M. *et al.* (2003) „ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures", *Cell*, 112(6), s. 819–829. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00158-2.
123. Suzuki, R., Rygh, L. J. a Dickenson, A. H. (2004) „Bad news from the brain: Descending 5-HT pathways that control spinal pain processing", *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(12), s. 613–617. doi: 10.1016/j.tips.2004.10.002.
124. Szallasi, A. (1994) „The vanilloid (capsaicin) receptor: Receptor types and species differences [Review]", *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(2), s. 223–243. doi: [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)90049-3).
125. Termeer, C. *et al.* (2002) „Oligosaccharides of Hyaluronan Activate Dendritic Cells via Toll-like Receptor 4", *The Journal of Experimental Medicine*, 195(1), s. 99–111. doi: 10.1084/jem.20001858.
126. Tonello, R., Lee, S. H. a Berta, T. (2018) „Monoclonal Antibody Targeting the Matrix Metalloproteinase 9 Prevents and Reverses Paclitaxel-Induced Peripheral Neuropathy in Mice", *Journal of Pain*. Elsevier Inc., 00(00), s. 1–13. doi: 10.1016/j.jpain.2018.11.003.
127. Touska, F. *et al.* (2011) „A ,cute' desensitization of TRPV1", *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(1), s. 122–9.

128. Tse, K. H. *et al.* (2014) „Primary sensory neurons regulate Toll-like receptor-4-dependent activity of glial cells in dorsal root ganglia", *Neuroscience*. IBRO, 279, s. 10–22. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.033.
129. Uchytlova, E., Spicarova, D. a Palecek, J. (2014) „TRPV1 antagonist attenuates postoperative hypersensitivity by central and peripheral mechanisms", *Molecular pain*, 10, s. 67. doi: 10.1186/1744-8069-10-67.
130. Urban, M. O. a Gebhart, G. F. (1999) „CENTRAL MECHANISMS IN PAIN", *Medical Clinics of North America*. Elsevier, 83(3), s. 585–596. doi: 10.1016/S0025-7125(05)70125-5.
131. Vandewauw, I. *et al.* (2018) „A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing", *Nature*. Nature Publishing Group, 555(7698), s. 662–666. doi: 10.1038/nature26137.
132. Varadaradjalou, S. *et al.* (2003) „Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human mast cells", *European Journal of Immunology*, 33(4), s. 899–906. doi: 10.1002/eji.200323830.
133. Viglianti, G. A. *et al.* (2003) „Activation of Autoreactive B Cells by CpG dsDNA", *Immunity*, 19(6), s. 837–847. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00323-6.
134. Vollmer, J. *et al.* (2005) „Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8", *The Journal of Experimental Medicine*, 202(11), s. 1575–1585. doi: 10.1084/jem.20051696.
135. Weaver, B. A. (2014) „How Taxol/paclitaxel kills cancer cells", *Molecular Biology of the Cell*, 25(18), s. 2677–2681. doi: 10.1091/mbc.e14-04-0916.
136. Woo, D. H. *et al.* (2008) „Direct activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) by Diacylglycerol (DAG)", *Molecular Pain*, 4, s. 1–15. doi: 10.1186/1744-8069-4-42.
137. Woolf, C. J. a Ma, Q. (2007) „Nociceptors—Noxious Stimulus Detectors", *Neuron*, 55(3), s. 353–364. doi: 10.1016/j.neuron.2007.07.016.
138. Xiao, W. H. *et al.* (2011) „Mitochondrial abnormality in sensory, but not motor, axons in paclitaxel-evoked painful peripheral neuropathy in the rat", *Neuroscience*. Elsevier Inc., 199, s. 461–469. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.10.010.
139. Xiao, W. H. a Bennett, G. J. (2012) „Effects of mitochondrial poisons on the neuropathic pain produced by the chemotherapeutic agents, paclitaxel and oxaliplatin", *Pain*. International Association for the Study of Pain, 153(3), s. 704–709. doi: 10.1016/j.pain.2011.12.011.
140. Yan, X. *et al.* (2015) „Paclitaxel induces acute pain via directly activating toll like receptor 4.", *Molecular pain*, 11(1), s. 10. doi: 10.1186/s12990-015-0005-6.
141. Yang, J. *et al.* (2014) „Different role of spinal 5-HT(hydroxytryptamine)₇ receptors and descending serotonergic modulation in inflammatory pain induced in formalin and carrageenan rat models", *British Journal of Anaesthesia*, 113(1), s. 138–147. doi: 10.1093/bja/aet336.
142. Yezierski, R. P. (2007) *Encyclopedia of Pain*. Editoval R. F. Schmidt a W. D. Willis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-540-29805-2.

143. Yiangou, Y. *et al.* (2001) „Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient", *the Lancet*, 357(April 28), s. 1338–1339.
144. Yoon, S.-Y., Patel, D. a Dougherty, P. M. (2012) „Minocycline blocks lipopolysaccharide induced hyperalgesia by suppression of microglia but not astrocytes", *Neuroscience*, 221, s. 214–224. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.024.
145. Zajackowska, R. *et al.* (2018) „Involvement of microglial cells in the antinociceptive effects of metamizol in a mouse model of neuropathic pain", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. Elsevier, 175(September), s. 77–88. doi: 10.1016/j.pbb.2018.09.008.
146. Zaroni, I. *et al.* (2011) „CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4", *Cell*, 147(4), s. 868–880. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.051.
147. Zeilhofer, H. U., Wildner, H. a Yevenes, G. E. (2012) „Fast Synaptic Inhibition in Spinal Sensory Processing and Pain Control [Review]", *Physiological Reviews*, 92(1), s. 193–235. doi: 10.1152/physrev.00043.2010.
148. Zhang, C. *et al.* (1997) „Locus coeruleus stimulation modulates the nociceptive response in parafascicular neurons: An analysis of descending and ascending pathways", *Brain Research Bulletin*, 42(4), s. 273–278. doi: 10.1016/S0361-9230(96)00262-6.
149. Zhang, H. *et al.* (2012) „Evidence that spinal astrocytes but not microglia contribute to the pathogenesis of paclitaxel-induced painful neuropathy", *Journal of Pain*. Elsevier Ltd, 13(3), s. 293–303. doi: 10.1016/j.jpain.2011.12.002.
150. Zhang, H. *et al.* (2016) „Dorsal root ganglion infiltration by macrophages contributes to paclitaxel chemotherapy induced peripheral neuropathy", *The Journal of Pain*. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/j.jpain.2016.02.011.
151. Zhang, H. a Dougherty, P. M. (2014) „Enhanced Excitability of Primary Sensory Neurons and Altered Gene Expression of Neuronal Ion Channels in Dorsal Root Ganglion in Paclitaxel-induced Peripheral Neuropathy", *Anesthesiology*, 120(6), s. 1463–1475. doi: 10.1097/ALN.0000000000000176.
152. Zhuo, M. (2017) „Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain", *Neuropharmacology*. Elsevier Ltd, 112, s. 228–234. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.08.014.